

Université Pierre et Marie Curie

École doctorale de Chimie Physique et de Chimie Analytique de Paris-Centre

CNRS USR 3149 / Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique

**Développement de nouvelles stratégies analytiques
pour la caractérisation moléculaire des états
d'oxydation à l'échelle protéomique**

Thèse de doctorat en Chimie Analytique

Présentée par

Shakir SHAKIR

Présentée et soutenue publiquement le 17/12/2015

Devant un jury composé de :

Pr. Laurence SABATIER , CNRS, Université de Strasbourg	Rapporteur
Pr. Caroline TOKARSKI , CNRS, Université de Lille	Rapporteur
Pr. Clotilde POLICAR , CNRS, ENS, Paris	Examineur
Dr. Delphine PFLIEGER , CNRS, CEA, Grenoble	Examineur
Pr. Fernando RODRIGUES-LIMA , CNRS, Université Paris Diderot	Examineur
Dr. Joëlle VINH , CNRS, ESPCI ParisTech	Directrice
Dr. Michel TOLEDANO , CEA, Saclay	Co-directeur



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

*À mes parents,
À ma famille,
À mes amis.*

*“With understanding, you won’t let it cast you down. A mind full of questions. A
current to purify”*

Science/Visions - CHVRCHES

Remerciements

Je ne pouvais commencer la rédaction de mon manuscrit de thèse sans remercier un nombre de personnes qui ont participé d'une manière ou d'une autre à l'accomplissement de ce travail. Mes premiers remerciements vont naturellement à Joëlle Vinh qui a dirigé ce projet. Je remercie Joëlle pour sa confiance, ses conseils et son soutien. J'ai beaucoup apprécié le travail au laboratoire SMBP grâce à l'ambiance à la fois professionnelle, chaleureuse et amicale que Joëlle a su instaurer au sein de cette équipe.

Je remercie également Michel Toledano qui a codirigé ce travail. L'enthousiasme de Michel et sa volonté de transmettre ses connaissances en biologie redox étaient une vraie motivation pour moi.

Mes remerciements vont aussi aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail de thèse : Caroline Tokarski, Laurence Sabatier, Clotilde Policar, Delphine Pflieger et Fernando Rodrigues-Lima.

Je tiens à remercier Isabelle Rivals de l'Equipe de Statistique Appliquée de l'ESPCI sans qui une partie ce travail n'aurait pas pu être possible. Je remercie Isabelle pour sa patience avec nous, d'avoir écouté nos envies de protéomistes et de les avoir appliquées à la mathématique.

Mes collègues avec qui j'ai partagé la vie pendant ces trois dernières années m'ont apporté un vrai support, je les remercie sincèrement. Le travail avec Giovanni Chiappetta a été un vrai plaisir, une vraie aventure! Son encadrement, son humour napolitain et son enthousiasme ont été essentiels pour la Team Redox que nous formons. Je remercie Sophie Liiu, qui est avant tout une vraie amie, les astuces et conseils de Sophie étaient vraiment précieux tout le long de ma thèse (RSLC Shakir > RSLC Sophie). Merci à Iman Haddad pour son aide en bio-informatique (surtout avec mes macros pénibles !) et pour nos discussions rigolotes. Iman a toujours su me rassurer quand j'ai pu avoir des doutes. Merci à Emmanuelle Demey pour les dépannages divers et variés (et son aide avec les mots fléchés !), Team RMQ ! Merci à Yann Verdier, (100 kilo-)maître de conférence ESPCI, pour sa bonne humeur ! Merci à Chiara Giangrande pour ses conseils, et je suis toujours partant pour l'idée d'ouvrir notre café parisien ! L'équipe SMBP a vraiment été une famille pour moi, je remercie tous les autres membres, anciens et présents pour cette expérience inoubliable.

Je tiens également à remercier Alise Ponsero de l'équipe de Michel Toledano pour les échantillons qui ont servi pour une grande partie de ce projet.

Je remercie également Gennaro Chiappetta de l'Istituto Nazionale Tumori pour les échantillons qui ont servi à l'étude du cancer anaplasique de la thyroïde.

Je me considère vraiment chanceux d'avoir non seulement beaucoup de support dans ma vie professionnel, mais autant dans ma vie de tous les jours. Merci à mes amis ECPMiens : Séverine, Pauline, Manon, Camille, Caroline, Sophie (encore une fois !), Cécile, Claire et Valentine, vive la Strasbourg Connection !

Le Liban aussi est représenté. Bilal, tu es omniprésent dans toutes les étapes de ma vie, je ne sais pas comment tu fais, mais nous rigolons bien en tout cas!

Un clin d'œil à mes amis parisiens, les lutins : François, Romain, Jul, Juju, Xavier, Paco, Vianney, Anthony, Thomas et Nico.

Ma plus grande reconnaissance et gratitude restent réservées à ma famille, mon guide et mon repère : ma mère et ma sœur. Papa on pense toujours à toi. Ce travail est dédié à vous.

Résumé

L'analyse des modifications post-traductionnelles est une des contributions les plus importantes de la protéomique aux sciences du vivant. Cependant, malgré les progrès des sciences séparatives et les développements techniques importants des dernières années en spectrométrie de masse, l'analyse quantitative des modifications post-traductionnelles constitue toujours un défi analytique. Le nombre limité de modifications identifiées d'une manière robuste par les algorithmes de recherche bio-informatiques, la nécessité d'étapes d'enrichissement et la quantification réalisée en se basant sur un seul peptide ne sont que quelques-unes des difficultés les plus évidentes. De plus, l'interprétation des données impose la prise de certaines précautions. Effectivement, la quantification des modifications post-traductionnelles devrait toujours être associée au niveau d'expression de la protéine afin d'éviter des faux positifs/négatifs. Plus spécifiquement, la modification redox des résidus cystéines constitue un cas d'étude très important, d'une part à cause de l'omniprésence de ces modifications dans le cadre du stress oxydatif et de l'homéostasie redox, et d'autre part à cause l'implication des modifications redox dans diverses cascades de signalisation et processus biologiques. Par ailleurs, quoique moins complexes que les glycosylations, les modifications redox des cystéines posent un défi supplémentaire vu l'hétérogénéité intrinsèque des formes oxydées et les variations importantes de la fraction modifiée (*site occupancy*).

Durant ce projet de thèse, plusieurs stratégies analytiques pour la quantification des modifications des cystéines ont ainsi été développées. La première stratégie, OcSILAC, associe un marquage métabolique des cultures cellulaires par des acides aminés contenant des isotopes lourds stables à un piégeage différentiel des thiols réduits et oxydés. Notamment, les thiols oxydés sont enrichis sélectivement par la technique de *biotin switch* qui augmente considérablement la gamme dynamique de notre analyse et permet la détection des espèces les moins abondantes. Le développement de cette méthode a été étendu à la mise en place de tout un processus analytique (ou *workflow*) pour le traitement des données générées vu le manque d'outils bio-informatiques adaptés disponibles. Avec OcSILAC nous pouvons avoir accès aux pourcentages des fractions des divers états redox et, dans certains cas, mettre en évidence la présence de modifications parallèles sur le peptide étudié (modification d'un autre acide aminé, oxydation irréversible de la cystéine, etc.). La stratégie OcSILAC a été appliquée à un modèle de levure n'exprimant pas la thiorédoxine réductase-1 qui a été

comparé à une souche sauvage. Ce modèle est intéressant puisque la suppression de la thiorédoxine réductase induit une perturbation importante des voies cellulaires régulées par le biais de modifications redox des cystéines. Les résultats obtenus sont en accord avec les études effectuées sur ce modèle et permettent de soulever des questions quant à la régulation de certaines voies métaboliques dans des conditions de stress.

La stratégie OcSILAC a ensuite été étendue et adaptée au fractionnement subcellulaire, le but étant d'étendre la couverture du redoxome dans nos études. Une première étude a été appliquée à une culture de cellules cancéreuses non traitées comparée à une culture de cellules traitées dans le cadre de l'étude du cancer anaplasique de la thyroïde. Les résultats obtenus confirment une réorganisation du cytosquelette suite au traitement, confirmant également la régulation redox de certaines de ses protéines. Les résultats soulèvent également des questions quant à la régulation redox de certaines machineries de protéines de choc thermique (*Heat Shock Protein*) impliquées fortement dans la progression du cancer anaplasique de la thyroïde.

Une deuxième stratégie de caractérisation et de quantification des modifications post-traductionnelles des cystéines a été ensuite développée. La stratégie OxiTMT se base sur un marquage chimique par des *tandem mass tags* spécifiques de la cystéine. Cette stratégie permet d'obtenir l'information quantitative concernant la fraction modifiée ainsi que l'information du niveau d'expression de la protéine. Une étude servant de preuve de concept a été effectuée sur une culture d'*Escherichia coli* ayant reçu un traitement oxydatif par comparaison à la même souche sans traitement. L'intérêt du développement d'une méthode basée sur un marquage chimique est la possibilité d'étendre les applications à l'étude des cultures cellulaires autotrophes, mais également à l'étude des tissus et biopsies.

En conclusion, nous proposons une boîte à outils comprenant plusieurs stratégies analytiques pour la caractérisation et la quantification des modifications redox sur les cystéines.

Table générale des matières

Table générale des matières	9
Liste des figures	13
Liste des tableaux.....	16
Liste des abréviations.....	17
Introduction générale.....	21
Partie I : Contexte scientifique et technologique	23
I. Chapitre I : Stress Oxydatif et Homéostasie Redox	25
I.1 Généralités	25
I.2 Les dérivés réactifs de l'oxygène	26
I.2.1 Les espèces les plus impliquées	27
I.2.2 Quelles sont les sources de ROS ?.....	28
I.3 Les autres espèces réactives	36
I.3.1 Les RNS : les dérivés réactifs de l'azote.....	36
I.3.2 Les RSS : les dérivés réactifs du soufre et du sélénium	37
I.3.3 Les RCS : les dérivés réactifs du chlore	38
I.3.4 Les espèces contenant du carbone.....	39
I.4 Stress oxydatif ou homéostasie redox ?	39
I.4.1 Quels dégâts résultent du stress oxydatif ?.....	40
I.4.2 L'implication des ROS dans les pathologies et le vieillissement	44
I.4.3 ROS signalisation/défense immunitaire	47
I.4.4 Discussion.....	53
I.4.5 Les familles de protéines impliquées dans l'homéostasie redox	56
I.4.6 Les petites molécules impliquées dans l'homéostasie redox (exemple du glutathion) ...	59
II. Chapitre II : Les techniques mises en œuvre	63
II.1 La Protéomique	63
II.1.1 Généralités	63
II.1.2 L'approche ascendante ou <i>bottom-up</i>	64
II.1.3 L'approche descendante ou <i>top-down</i>	66
II.1.4 Comparaison des deux approches <i>bottom-up</i> et <i>top-down</i>	66
II.2 Les modifications post-traductionnelles	68
II.2.1 La protéomique redox et les modifications sur la cystéine	69
II.3 La quantification par spectrométrie de masse.....	75

II.3.1	Les méthodes de quantification en protéomique	76
II.3.2	La quantification des PTMs : défis et considérations générales.....	81
II.3.3	Discussion.....	83
II.4	<i>Détection et quantification des modifications redox sur les cystéines</i>	85
II.4.1	Considérations générales	86
II.4.2	La quantification des modifications redox sur les cystéines : Etat de l'art.....	87
II.5	<i>Autres techniques pour la caractérisation des cystéines</i>	93
II.6	<i>Discussion</i>	96
Partie II : Résultats et discussions.....		99
III. Chapitre III : OcSILAC, une stratégie analytique redox basée sur un marquage métabolique		101
III.1	<i>Introduction</i>	101
III.2	<i>Le protocole de la stratégie OcSILAC.....</i>	102
III.3	<i>Les différentes étapes de la mise en place du protocole.....</i>	104
III.3.1	La souche utilisée pour la mise au point : Δ TRR1	104
III.3.2	Le marquage SILAC.....	105
III.3.3	L'extraction des protéines	108
III.3.4	L'alkylation des cystéines libres	108
III.3.5	La réduction des cystéines oxydées	110
III.3.6	Le marquage à la biotine HPDP	113
III.3.7	L'enrichissement des cystéines oxydées.....	114
III.4	<i>L'analyse nanoLC-MS</i>	115
III.5	<i>Traitement des données générées par OcSILAC.....</i>	115
III.5.1	Préparation des données	116
III.5.2	Estimation des rapports de niveaux d'expression des protéines et des rapports des cystéines oxydées et réduites.....	116
III.5.3	Estimation des pourcentages des formes oxydée et réduite dans chacune des souches étudiées.....	117
III.6	<i>Pour aller plus loin, le fractionnement subcellulaire.....</i>	119
III.6.1	Vérification du blocage des cystéines libres	120
III.6.2	Etude de la possibilité d'oxydations non spécifiques dues au protocole modifié...	123
III.6.3	Contrôle de l'efficacité du fractionnement subcellulaire.....	124
III.7	<i>Conclusion</i>	126
IV. Chapitre IV : OcSILAC - Résultats et Discussions.....		127
IV.1	<i>Application du protocole OcSILAC au modèle de levure ΔTRR1</i>	127
IV.1.1	Article en cours de soumission.....	127
IV.1.2	Commentaires	146

IV.2	<i>Une première application du protocole OcSILAC avec fractionnement subcellulaire : cas du cancer anaplasique de la thyroïde.....</i>	151
IV.2.1	Introduction	151
IV.2.2	Résultats et discussions.....	153
IV.3	Conclusion.....	167
V.	Chapitre V : OxiTMT, une stratégie analytique redox basée sur un marquage chimique.....	169
V.1	Introduction	169
V.2	OxiTMT : le concept.....	169
V.3	La mise au point du protocole OxiTMT.....	170
V.4	Application du concept OxiTMT à l'étude d'une culture d' <i>Escherichia coli</i> traitée par un agent oxydant : article en cours de soumission	171
V.5	Commentaires et conclusion	192
	Conclusion générale	195
VI.	Conclusion Générale.....	197
	Annexes	207
I.	Annexe I : La spectrométrie de masse et le couplage nanoLC-MS.....	209
I.1	Historique.....	209
I.2	Principe.....	210
I.3	Source d'ionisation: NanoElectrospray (NanoESI)	210
I.4	Les analyseurs.....	211
I.4.1	Résolution.....	212
I.4.2	Précision de masse.....	212
I.4.3	Gamme de masse.....	214
I.4.4	Vitesse d'acquisition	214
I.4.5	Gamme dynamique	214
I.5	La spectrométrie de masse tandem (MS/MS).....	215
I.5.1	La fragmentation générale des peptides.....	215
I.5.2	Dissociation induite par collision à plus haute énergie (HCD).....	217
I.6	Le couplage avec la chromatographie.....	219
I.6.1	Généralités	219
I.6.2	La nano-chromatographie (nanoLC).....	220
I.7	Configuration instrumentale.....	221
I.7.1	QqOrbitrap.....	221
II.	Annexe II : Protocoles expérimentaux.....	224

II.1	<i>La séparation en nano-LC</i>	224
II.2	<i>L'analyse MS.....</i>	224
II.3	<i>La recherche avec le logiciel MaxQuant</i>	224
II.4	<i>La recherche avec le logiciel Proteome Discoverer.....</i>	225
II.5	<i>Le traitement avec le logiciel Pinpoint</i>	225
III.	Références.....	227

Liste des figures

Figure 1 – Nombre d'articles scientifiques contenant le terme « Oxidative Stress » depuis 1980	25
Figure 2 - Schéma général représentant les différentes étapes de la réduction de l'oxygène et de ses dérivés en eau.	27
Figure 3 - Représentation schématique de l'oxydation du glucose dans la cellule	30
Figure 4 - Représentation des complexes I, II, III et IV au niveau de la membrane interne de la mitochondrie	31
Figure 5 - structures semi-développées de la méthionine sulfone et de la méthionine sulfoximine.	41
Figure 6 - structure semi-développée de la 8-oxoguanine	42
Figure 7 - Nombre d'articles traitant la thématiques des ROS	47
Figure 8 - Formule semi-développée de la L-cystéine	48
Figure 9 - Co-évolution des systèmes thiols avec la complexité biologique.	49
Figure 10 - Représentation schématique du fonctionnement du système de relais redox MIA40-ERV1	50
Figure 11 - Production de H ₂ O ₂ durant la régénération de la queue d'un têtard de <i>Xenopus laevis</i>	52
Figure 12 - Génération des différents dérivés réactifs : ROS, RNS et RSS	55
Figure 13 - Représentation schématique de la réduction du pont disulfure d'une protéine par le système TRX-TRR.	58
Figure 14 - Formule semi-développée du glutathion	60
Figure 15 - Formules semi-développées de quelques petites molécules endogènes et exogènes ayant des propriétés antioxydantes.	61
Figure 16 - La nomenclature des fragments adoptée aujourd'hui a été initiée par Roepstorff et Fohlman en 1984 puis complétée par Biemann en 1990	65
Figure 17 - Protéomique <i>Shotgun</i> : image résumant le déroulement classique d'une analyse protéomique	66
Figure 18 - L'approche <i>top-down</i> fournit des informations sur les phénotypes.	67
Figure 19 - Représentation schématique de l'action d'une protéine disulfure isomérase (PDI) sur une protéine.	71
Figure 20 - Les principales modifications réversibles et irréversibles sur les cystéines	75
Figure 21 - Représentation schématique d'un marquage métabolique SILAC pour comparer deux cultures cellulaires représentant deux conditions différentes.	77
Figure 22 - Représentation schématique d'un marquage chimique avec quantification relative en MS/MS par ions rapporteurs.	79
Figure 23 - Représentation schématique des méthodes quantitatives usuelles en spectrométrie de masse protéomique	83

Figure 24 - Représentation schématique du protocole expérimental de la stratégie OxICAT	89
Figure 25 - Formule semi-développée de la biotine HPDP.....	89
Figure 26 - Résumé du protocole suivi pour enrichir les cystéines oxydées sélectivement en utilisant la technique de <i>biotin switch</i>	90
Figure 27 - Représentation schématique du protocole de la stratégie OxTRAQ.	91
Figure 28 - Schéma résumant le protocole expérimental de la méthode OxMRM	92
Figure 29 - Schéma résumant le protocole expérimental du marquage séquentiel des cystéines à l'iodoTMT	93
Figure 30 - Séparation par gels d'électrophorèse 2D d'extraits de protéines de levure où les thiols libres et oxydés sont marqués différenciellement.....	94
Figure 31 - Représentation schématique des différentes étapes de l'électrophorèse diagonale pour l'identification des ponts disulfure intermoléculaires	95
Figure 32 - Schéma résumant le protocole suivi dans la procédure OcSILAC.....	102
Figure 33 - Schéma simplifié des deux voies redox cellulaires et quelques-unes de leurs cibles chez la levure (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	105
Figure 34 - Extrait d'un spectre MS montrant le signal obtenu pour le peptide GDLGIEIPAPEVLAVQK.	107
Figure 35 - Séparation SDS-PAGE d'extraits de protéomes ayant subi différentes conditions d'alkylation à l'IAM.....	109
Figure 36 - Séparation SDS-PAGE d'extraits de protéomes ayant subi différentes conditions d'alkylation au NEM.....	110
Figure 37 - Comparaison de plusieurs conditions de réduction des cystéines.	111
Figure 38 - Comparaison des intensités des cystéines carbamidométhylées	112
Figure 39 - Comparaison des intensités des cystéines carbamidométhylées (suite).	113
Figure 40 - Séparation SDS-PAGE des différentes fractions subcellulaires ayant subi différentes conditions d'alkylation à l'IAM	121
Figure 41 - Séparation SDS-PAGE des différentes fractions subcellulaires ayant subi différentes conditions d'alkylation à l'IAM (pH 8).....	122
Figure 42 - représentation de la distribution des ratios r_{ox} et r_{re} corrigés par le niveau d'expression de la protéine.....	123
Figure 43 - Comparaison de l'efficacité de fractionnement selon le protocole du fournisseur et selon le protocole adapté à la stratégie OcSILAC.....	125
Figure 44 - Spectre MS/MS du peptide NGTVLPCNWTPGAATIKPTVEDSK contenant le cystéine catalytique de la peroxyrédoxine TSA1.....	150
Figure 45 - Spectre MS acquis pour la forme oxydée du peptide LVVVDFFATWCGPCK, contenant le site catalytique de la thiorédoxine-2.....	151
Figure 46 - Représentation schématique du protocole expérimental de la stratégie OxTMT.	170
Figure 47 - Séparation SDS-PAGE d'extraits de cellules HeLa pour vérifier l'efficacité de l'alkylation à l'iodoTMT.	171

Figure 48 - Image d'un <i>Stage tip</i> contenant une phase C ₁₈ et utilisé pour le dessalage des échantillons peptidiques..	202
Figure 49 - Séquence d'images montrant l'introduction d'une gouttelette puis sa fusion avec une autre microgouttelette.	203
Figure 50 : Représentation schématique des fractions du protéome (en bleu) qui peuvent être identifiées (en rouge) et quantifiées (en orange) par spectrométrie de masse.	210
Figure 51 : Photographie d'un capillaire nanoESI (SillicapTip TM , New Objective).	211
Figure 52 : Résolution à 50%.	212
Figure 53 : Illustration de la fidélité et de la justesse.	213
Figure 54 : Concentration de 70 protéines dans le plasma.	215
Figure 55 : Répartition des principales protéines plasmatiques.	215
Figure 56 : Nomenclature de la fragmentation de la chaîne peptidique pour un tétrapeptide.	216
Figure 57 : Fragmentation HCD des ions précurseurs dans un QqOrbitrap.	218
Figure 58 : Potentiel appliqué pour la fragmentation en HCD.	218
Figure 59 : Schéma détaillé du Q Exactive (Thermo Scientific).	222
Figure 60 : Acquisition data-dépendant (DDA) sur le QqOrbitrap.	223

Liste des tableaux

Tableau 1 - Membres de la famille des NADPH oxydases et leur localisation cellulaire.	34
Tableau 2 - Les dérivés réactifs d'azote principaux et leur formation	37
Tableau 3 - Les espèces radicalaires contenant du soufre et leurs sources possibles	38
Tableau 4 - Régulateurs clés pouvant s'oxyder en réponse au stress oxydatif durant la différenciation des cellules souches	53
Tableau 5 - Exemples de PTMs sur les chaînes latérales de certains acides aminés.	69
Tableau 6 - Différents types de marquage chimique et les sites concernés par ces marquages	80
Tableau 7 - Exemple numérique 1	146
Tableau 8 - Exemple numérique 2	147
Tableau 9 - Exemple numérique 3	148
Tableau 10 - Exemple numérique 4	148
Tableau 11 - Exemple numérique 5	149
Tableau 12 - Protéines surexprimées dans la souche traitée <i>si<i>bag3</i></i>	153
Tableau 13 - Protéines sous-exprimées dans la souche traitée <i>si<i>bag3</i></i>	154
Tableau 14 - Liste des séquences peptidiques contenant des cystéines dont la fraction oxydée (r_{ox} normalisé) augmente	158
Tableau 15 - Liste des séquences peptidiques contenant des cystéines dont la fraction oxydée (r_{ox} normalisé) diminue	159
Tableau 16 - Liste des séquences peptidiques contenant des cystéines dont la fraction réduite (r_r normalisé) augmente	160
Tableau 17 - Liste des séquences peptidiques contenant des cystéines dont la fraction réduite (r_r normalisé) diminue.	162
Tableau 18 - Comparaison des méthodes OcSILAC et OxiTMT	201
Tableau 19 : Récapitulatif des différentes performances des analyseurs	212
Tableau 20 : Temps d'acquisition du transient	222

Liste des abréviations

AQUA : *Absolute QUAntification of proteins*

ARE : éléments de réponse antioxydante (*Antioxidant Response Element*)

ASK1 : *Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*

AUC : aire sous la courbe (*Area Under the Curve*)

BAG3 : *B-cell lymphoma-2-associated athanogene 3*

BRAF : *B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*

C₁₈ : phase octadécyle, chaînes alkyles à 18 atomes de carbone

CAM : CarbAmidoMéthylation

CEB : *Cytoplasmic Extraction Buffer*

CID : *Collision-Induced Dissociation*

CoQ : Coenzyme Q10 (ou ubiquinone)

COX : Cyclo-OXygénases

Cys : Cystéine

Cyt c : Cytochrome c

DTT : DiThioThréitol

ECD : *Electron-Capture Dissociation*

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

ERK : *Extracellular-signal-Regulated Kinase*

ERO1 : Oxydoréductine-1 du réticulum endoplasmique (*Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin-1*)

ERV1 : *sulfhydryl oxidase Essential for Respiration and Viability 1*

ESI : ionisation par électronébuliseur (*ElectroSpray Ionization*)

ETC : chaîne de transport d'électrons (*Electron Transport Chain*)

ETD : *Electron-Transfer Dissociation*

FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide (forme réduite)

FTICR : analyseur à résonance cyclotronique d'ion (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*)

GLR : glutathion réductase

GPX : glutathion peroxydases

GRX : glutarédoxines

GSH : glutathion

GSSG : disulfure de glutathion

H : souche marquée aux isotopes lourds (*Heavy*)

HCD : *Higher-energy Collisional Dissociation*

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

Hsp: *Heat Shock Protein*

IAM : IodoAcétaMide

ICAT : *Isotope-Coded Affinity Tag*

IRMPD : *InfraRed MultiPhoton Dissociation*

iTRAQ : *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation*

I_κB : *Inhibitor of nuclear factor kappa-B*

JNK : *c-Jun N-terminal Kinase*

Keap1 : *Kelch ECH Associating Protein 1*

L : souche marquée aux isotopes légers (*Light*)

LDL : lipoprotéines de basse densité (*Low-Density Lipoprotein*)

LOX : LipOXygénases

MALDI : désorption-ionisation laser assistée par matrice (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)

MAO : MonoAmine Oxydase

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MEB : *Membrane Extraction Buffer*

MIA40 : *Mitochondrial intermembrane space Import and Assembly protein 40*

MRM : *Multiple Reaction Monitoring*

MS : spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*)

MS/MS : spectrométrie de masse en mode tandem

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme réduite)

NEB : *Nuclear Extraction Buffer*

NEM : N-EthylMaléimide

NF-_κB : *Nuclear Factor kappa-B*

NOX : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) OXYdases

Nrf2 : *Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2*

PDI : Protéine Disulfure Isomérase

PEP : *Posterior Error Probability*

PMP : Polypeptides Membranaires du Peroxysome

PRX : Peroxyrédoxines

PSAQ : *Protein Standard Absolute Quantification*

PTM : modification post-traductionnelle (*Post Translational Modification*)

QconCAT : *Quantification conCATamer*

r : moyenne des rapports d'intensité de signal relatif aux peptides protéotypiques marqués par des isotopes lourds sur l'intensité de signal relatif aux peptides de la même protéine marqués par des isotopes légers

RCS : dérivé réactifs du chlore (*Reactive Chlorine Species*)

RNS : dérivés réactifs de l'azote (*Reactive Nitrogen Species*)

ROS : dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)

r_{ox} : rapport d'intensité de signal d'un peptide marqué par des isotopes lourds et contenant une cystéine oxydée sur l'intensité de signal du même peptide marqué par des isotopes légers

r_{re} : rapport d'intensité de signal d'un peptide marqué par des isotopes lourds et contenant une cystéine réduite sur l'intensité de signal du même peptide marqué par des isotopes légers

RSS : dérivés réactifs du soufre et du sélénium (*Reactive Sulfur/Selenium Species*)

SILAC : marquage métabolique des cultures cellulaires par isotopes stables (*Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture*)

siRNA : petit ARN interférent (*Small Interfering RNA*)

SOD : SuperOxyde Dismutase

SRM : *Selected Reaction Monitoring*

TCA : acide trichloroacétique (*TriChloroacetic Acid*)

TCEP : Tris(2-CarboxyEthyl)Phosphine

TMT : *Tandem Mass Tags*

TOM : *Translocase of Outer Membrane*

TRR : Thiorédoxine réductase

TRX : Thiorédoxine

UPR : *Unfolded Protein Response*

WT : souche sauvage (*Wild Type*)

XIC : *eXtracted-Ion Chromatogram*

Introduction générale

‘La science est une aventure humaine’. Il n’y a pas d’exagération à dire que la Recherche est née en même temps que la naissance de l’humanité. En effet, si la Recherche scientifique telle que nous la connaissons actuellement est portée par deux grandes forces motrices, l’envie d’améliorer les conditions de vie et la curiosité, ces deux facteurs ont toujours été présents dès l’existence des tous premiers Hommes sur terre. La Recherche dans le domaine des sciences du vivant est un parfait exemple pour illustrer ceci. Comprendre le fonctionnement du corps humain et de son environnement a pour but ultime d’améliorer les conditions de vie, de faire face aux pathologies qui peuvent survenir, d’étendre l’espérance de vie, etc.

Plus spécifiquement, la protéomique est la science qui étudie les protéomes pour élucider les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués. **Un protéome est défini comme l’ensemble des protéines exprimées par le génome d’une cellule, d’un tissu ou d’un organe dans un environnement donné et à un moment donné.** Le protéome constitue donc une entité complexe et surtout dynamique. Les protéines sont directement corrélées à l’information fonctionnelle alors que les gènes sont le support de l’information génétique. Chaque protéine a une structure et une fonction qui lui est propre. Ces fonctions sont souvent régulées par des modifications post-traductionnelles qui peuvent également déterminer la localisation d’une protéine, ses interactions avec d’autres protéines et même son devenir. Il est vrai que nous nous dirigeons actuellement vers une caractérisation plus fine des modifications post-traductionnelles grâce aux développements instrumentaux des dernières années. Cette caractérisation dépasse la simple identification des modifications et va jusqu’à leur quantification et l’estimation de leur proportion, avec tout ce que ceci engendre comme défis analytiques et bio-informatiques.

Dans ce cadre, la notion de stress oxydatif est une notion très présente surtout dans les études des modifications post-traductionnelles des résidus cystéines. Ce phénomène est également très étudié en médecine puisque la notion de stress oxydatif est présente dans de nombreuses pathologies comme les cancers et les maladies neurodégénératives. Et même si la dualité ‘cause-effet’ de l’implication du stress oxydatif constitue, au cas par cas, un sujet de débat et de recherche, la caractérisation des modifications post-traductionnelles des résidus cystéines à cause des changements des conditions redox cellulaires reste le meilleur moyen de comprendre ces phénomènes et les mécanismes sous-jacents.

Ainsi le travail effectué pendant ce projet avait pour but le développement de stratégies analytiques pour la caractérisation et la quantification des modifications redox sur les résidus cystéines. Différentes approches ont été envisagées et différentes considérations ont été prises en compte afin de générer des données fiables et robustes. Ce manuscrit présentera le travail accompli, il sera divisé en deux grandes parties. Une première partie intitulée ‘Contexte scientifique et technologique’ introduira les deux grands thèmes de ce projet, à savoir le stress oxydatif (Chapitre I) et la protéomique (Chapitre II). La deuxième partie intitulée ‘Résultats et discussions’ détaillera le travail effectué pendant ce projet, à savoir le développement la stratégie OcSILAC (Chapitre III), deux premières applications de la stratégie OcSILAC (Chapitre IV) et finalement le développement de la stratégie OxiTMT (Chapitre V).

Partie I : Contexte scientifique et technologique

Chapitre I : Stress Oxydatif et Homéostasie Redox

I.1 Généralités

Le stress oxydatif (ou stress oxydant) est défini comme étant un déséquilibre entre la production des dérivés réactifs de l'oxygène, ou ROS (*Reactive Oxygen Species*), et les défenses antioxydantes d'un organisme ou d'une cellule [1]. Ce concept a été introduit pour la première fois par Helmut Sies dans le chapitre introductif de son livre '*Oxidative Stress*' publié en 1985 [2] et revu en 1991. Les publications dans ce nouveau domaine de l'époque se succèdent et s'affinent, le livre *Antioxidant and Redox Regulation of Genes* est paru en 1999. Quant aux articles scientifiques, ils sont publiés initialement dans différents journaux scientifiques en biologie et en enzymologie, et ensuite dans des journaux scientifiques dédiés qui ont vu le jour grâce au développement de la recherche dans ce domaine. Ainsi nous comptons actuellement plusieurs journaux spécialisés dont : *Free Radical Research* (depuis 1985), *Free Radical Biology and Medicine* (depuis 1987), *Redox Reports* (depuis 1999), *Antioxidants & Redox Signaling* (depuis 1999) et plus récemment *Redox Biology* (depuis 2013). Le nombre important de publications et articles scientifiques atteste de l'intérêt en ce domaine. Ce chiffre est en croissance continue depuis les années 1980 (Figure 1).

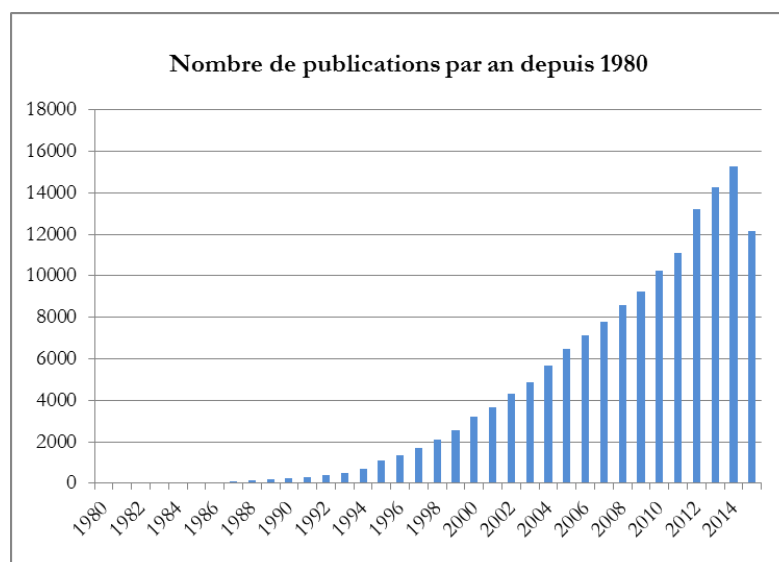


Figure 1 – Nombre d'articles scientifiques contenant le terme « Oxidative Stress » depuis 1980. Recherche effectuée sur PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) le 01/09/2015

La définition initiale du stress oxydatif comme étant un déséquilibre a été ensuite mise à jour et complétée pour inclure les effets de ce déséquilibre, c'est à dire la perturbation de la signalisation et du contrôle redox et/ou des dégâts moléculaires. De nos jours, une définition plus large est acceptée pour englober toute perturbation de l'homéostasie redox puisque des teneurs en ROS inférieures aux niveaux physiologiques sont connues pour avoir elles aussi des effets délétères. Ceci provient du fait que les ROS jouent paradoxalement un rôle important en tant que messagers secondaires permettant la transduction de signal [3], [4].

I.2 Les dérivés réactifs de l'oxygène

Il est difficile actuellement de lire un journal médical sans rencontrer la notion des dérivés réactifs de l'oxygène ou de leurs implications dans diverses pathologies. La première mention de l'appellation « *Reactive Oxygen Species* » (ROS) remonte à 1977. Il n'est guère étonnant que le nombre d'articles s'intéressant à ces espèces, leurs spéciations, leur chimie et leurs rôles biologiques soit très élevé, rendant quasi impossible de trouver des revues pouvant résumer toutes les années de travaux de recherche sur les ROS. Mais, peu importe l'article ou la revue traitant le sujet, en évoquant les ROS, plusieurs types d'espèces sont souvent regroupés dans cette famille, à savoir des radicaux libres et des espèces non radicalaires.

Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Les électrons occupent des régions de l'espace définies comme « orbitales ». Ainsi, un radical libre peut être défini comme étant une espèce chimique capable d'exister d'une manière indépendante et possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur son orbitale externe [5]. La présence d'un électron non apparié confère à l'espèce une réactivité accrue vu la tendance naturelle de l'électron libre à s'apparier avec un autre électron [6]. La grande majorité des molécules biologiques sont non radicalaires. Il a été même longtemps considéré que les radicaux libres ne pouvaient pas exister dans les systèmes biologiques vu leur réactivité et par conséquent leur durée de vie réduite. La présence des radicaux libres a été démontrée pour la première fois dans un système biologique en 1954 [7].

I.2.1 Les espèces les plus impliquées

L'oxygène est un élément chimique présent naturellement dans tous les organismes et jouant une variété de rôles très importants. La structure de la couche de valence de cet élément (s^2p^4) fait qu'il est actif d'un point de vue redox dans les conditions physiologiques et participe ainsi à de nombreuses fonctions vitales. L'oxygène est présent sous des degrés d'oxydation allant de 0 pour le dioxygène O_2 à -1 pour le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Les ROS proviennent essentiellement de réactions successives de réduction du dioxygène. Dans les cellules, plus de 95% de l'oxygène consommé par la mitochondrie est réduit directement en eau au niveau de la chaîne de transport d'électrons par la cytochrome C oxydase, sans production de ROS. Alternativement, une quantité minoritaire d'oxygène est réduite par des réactions successives avec ajout d'un seul électron, menant à la formation séquentielle de l'ion radicalaire **superoxyde** $O_2^{\bullet -}$ puis du **peroxyde d'hydrogène** H_2O_2 . Le peroxyde d'hydrogène est en suite dismuté pour donner l'ion hydroxyle HO^- et le **radical hydroxyle** HO^\bullet . Cette dismutation est connue sous le nom de la réaction de Fenton, réaction catalysée par un métal (Cu, Zn, Mn,...). La réaction de réduction du radical hydroxyle se termine par le gain d'un électron et d'un proton, menant à la formation de l'eau. Dans une cellule, cette dernière étape se déroule par l'interaction du radical hydroxyle avec une biomolécule telle que l'ADN, une protéine, un lipide ou une petite molécule, initiant ainsi une chaîne de réactions. Les 2 voies possibles de réduction de l'oxygène en H_2O sont représentées dans la Figure 2.

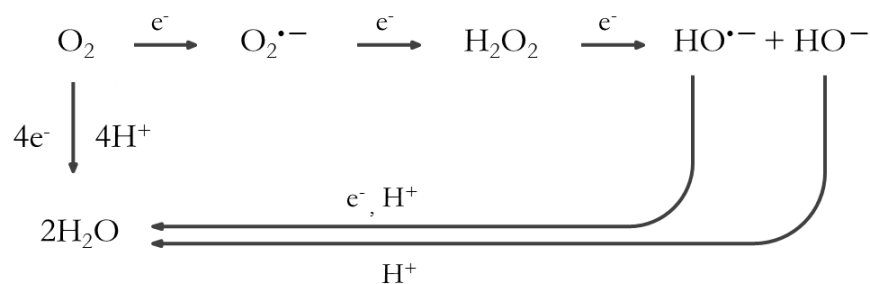
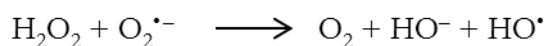


Figure 2 - Schéma général représentant les différentes étapes de la réduction de l'oxygène et de ses dérivés en eau.

A ce schéma général s'ajoutent d'autres réactions possibles entre les dérivés de l'oxygène, telles que la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et l'ion radicalaire superoxyde pour produire le radical hydroxyle selon la réaction de Haber–Weiss:



Les dérivés réactifs de l'oxygène peuvent également réagir avec d'autres espèces réactives pour générer d'autres ROS. Notamment le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peut réagir avec les ions hypochlorites ClO^- pour générer de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, état excité de l'oxygène triplet et espèce réactive non radicalaire [8].

I.2.2 Quelles sont les sources de ROS ?

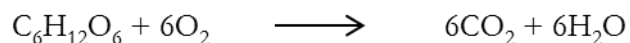
I.2.2.1 Les mitochondries

La consommation en oxygène des **mitochondries** représentent 85 à 90% de la consommation d'une cellule en oxygène. Cet oxygène est réduit essentiellement en eau, alors qu'une réduction partielle de l'oxygène mène à la formation de ROS. Les mitochondries possèdent leur propre système d'élimination des ROS qui sera détaillé plus loin. Cependant il a été démontré que les mitochondries produisent les ROS à des niveaux plus importants que leur élimination, ce qui conduit à un excédent de 1 à 3% de l'oxygène consommé suite à ce métabolisme incomplet [9], [10]. Ainsi il n'est guère étonnant que ces organites soient le site principal de la production des ROS. Il faut noter également que les mitochondries de différents tissus diffèrent dans leurs activités spécifiques et dans les enzymes qui participent au métabolisme. La production des ROS varie donc selon la disponibilité de l'oxygène dans les tissus et organes où ces mitochondries sont situées [11].

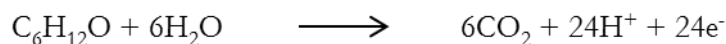
La consommation d'oxygène par les organismes vivants a été démontrée par Antoine Lavoisier qui écrit en 1789 [12]:

« ... en général, la respiration n'est qu'une combustion lente de carbone et d'hydrogène, qui est semblable en tout à celle qui s'opère dans une lampe ou dans une bougie allumée et, sous ce point de vue, les animaux qui respirent sont de véritables corps combustibles qui brûlent et se consomment. »

Lavoisier avait démontré également la génération de dioxyde de carbone CO_2 par les organismes vivants. Ce CO_2 provient de l'oxydation complète de glucose par l'oxygène selon la réaction redox suivante :



Cette équation peut être détaillée en 2 demi-réactions, dont l'oxydation du glucose selon :



Et la réduction de l'oxygène selon :



Les électrons impliqués dans l'oxydation du glucose ne sont pas transmis directement à l'oxygène, mais dans un premier temps à 2 coenzymes, le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+/NADH) et la flavine adénine dinucléotide (FAD/FADH_2) pour produire du NADH et FADH_2 à partir de NAD^+ et FAD respectivement. Cette première étape produisant en tout 10 NADH et 2 FADH_2 (par molécule de glucose au départ) comprend la glycolyse qui se déroule dans le cytoplasme et le cycle de Krebs (ou également le cycle de l'acide citrique) qui a lieu dans la mitochondrie (Figure 3).

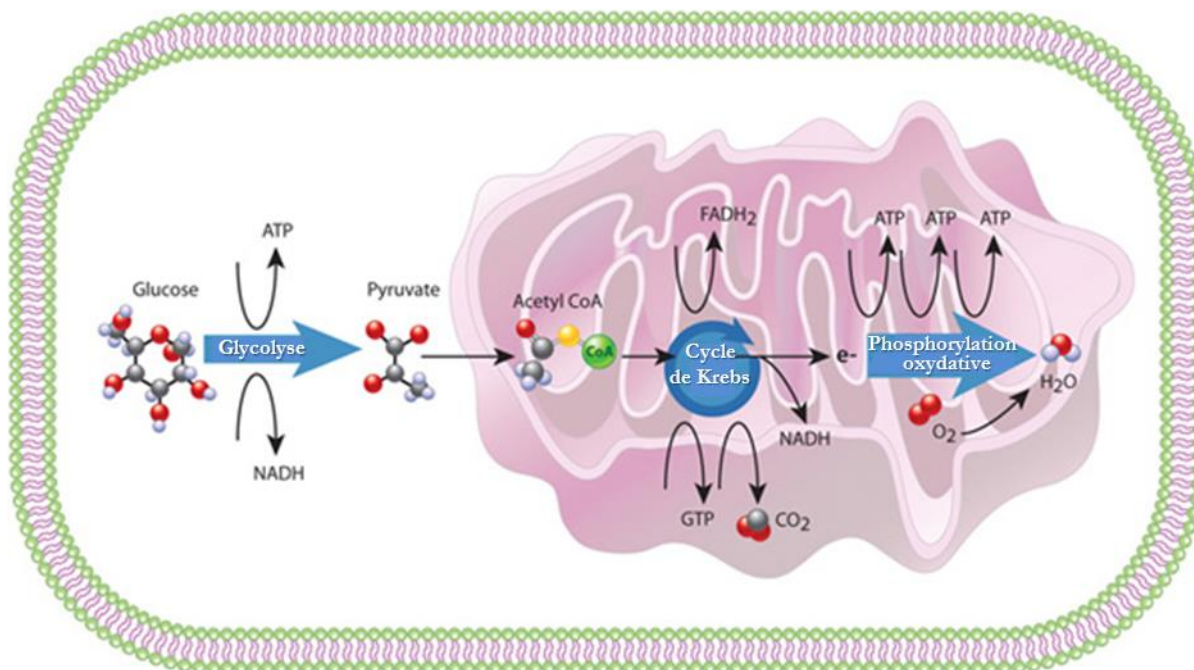


Figure 3 - Représentation schématique de l'oxydation du glucose dans la cellule qui comprend la glycolyse dans le cytoplasme et le cycle de Krebs au niveau de la mitochondrie. Image tirée et adapté de la librairie informatique *Nature Education*. (Adresse de l'image originale : <http://www.nature.com/scitable/content/metabolism-in-a-eukaryotic-cell-glycolysis-the-14705577>)

Le processus de transfert des électrons du glucose à l'oxygène se poursuit dans la mitochondrie, au niveau de la chaîne de transport d'électrons ou ETC (*Electron Transport Chain*) détaillé à la Figure 4. L'ETC est un système comportant 4 complexes protéiques membranaires situés au niveau de la membrane interne de la mitochondrie chez les eucaryotes et au niveau de membrane cytoplasmique chez les procaryotes. L'ETC est la dernière étape de la respiration aérobie et constitue la seule étape du métabolisme du glucose qui consomme l'oxygène. Cette étape peut être schématisée comme une série de réactions redox ou une course de relais pendant laquelle les électrons sont transférés d'une composante à une autre. Brièvement, les électrons transportés par NADH sont transmis au Complexe I (ou NADH-déshydrogénase), alors que FADH₂ contourne le Complexe I et transmet les électrons transportés directement au Complexe II (ou succinate déshydrogénase). L'ubiquinone récupère ensuite les électrons des Complexes I et II et les transmet au Complexe III (ou coenzyme Q-cytochrome C réductase). A son tour, le Complexe III transmet les électrons reçus au cytochrome C qui, lui, transmet ces électrons en suite au Complexe IV (ou cytochrome C oxydase). Le Complexe IV est impliqué dans l'étape ultime et exclusive où l'oxygène est réellement réduit en H₂O.

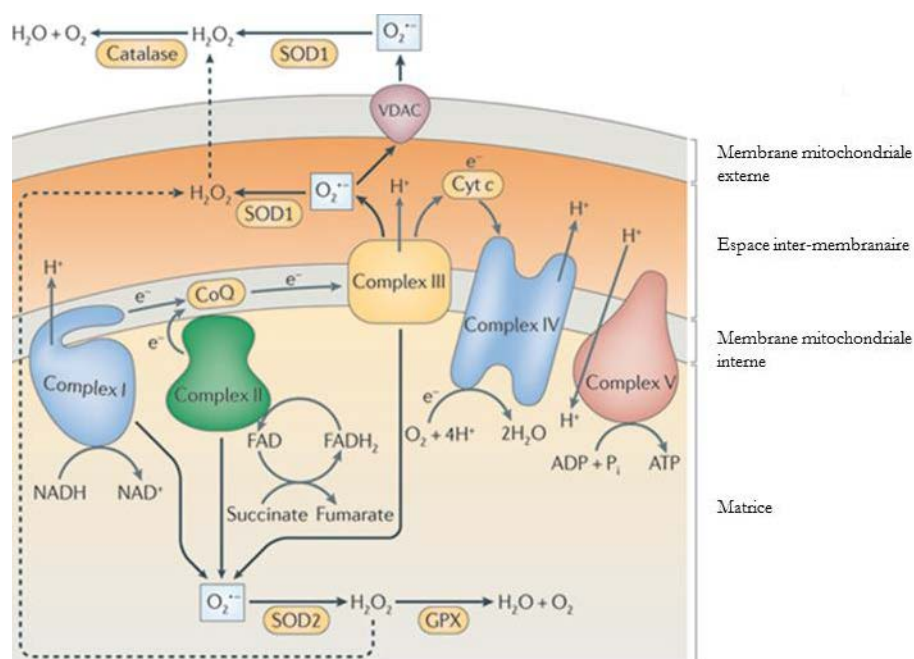


Figure 4 - Représentation des complexes I, II, III et IV au niveau de la membrane interne de la mitochondrie ainsi que les réactions d'oxydoréduction relatives à chaque complexe [13]. Abréviations - Ubiquinone : CoQ, Cytochrome c : Cyt c.

Les études ont montré le rôle des Complexes I, II et III dans la génération des ROS mitochondriaux, notamment l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ dismuté ensuite en H_2O_2 [14], [15], [16]. L'ubiquinone est considérée comme la source de production de $O_2^{\bullet-}$ via son cycle d'oxydation et de réduction, menant à la formation de semiquinone, radical peu stable [17].

En plus de l'ETC, la mitochondrie comporte un nombre d'enzymes responsables de la production de ROS (les oxydoréductases). Parmi ces enzymes, nous comptons la dihydroorotate déshydrogénase (flavoprotéine impliquée dans la synthèse *de novo* de pyrimidine) [18], la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale (mGPD, KEGG 1.1.5.3)[19] et la dihydrolipoamide déshydrogénase (oxydoréductase contenant un site actif thiol-disulfure et qui fait partie des complexes oxoglutarate déshydrogénase et pyruvate déshydrogénase mitochondriaux) [20]. La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase 4 (NOX4) est une autre source de ROS dans la mitochondrie et sera évoquée plus loin.

Une autre source de ROS liée à la mitochondrie est la monoamine oxydase (MAO). Cette flavoprotéine, existant en deux isoformes MAO-A et MAO-B, est située au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et catalyse la déamination oxydative des neurotransmetteurs et génère des quantités importantes de peroxyde d'hydrogène [21].

I.2.2.2 Les peroxysomes

Les peroxysomes constituent un autre site de génération de ROS dans la cellule. Ces organites omniprésents dans les cellules eucaryotes sont entourés d'une membrane simple et ne contiennent pas d'ADN. Identifiés en 1966 [22], les peroxysomes doivent leur nom à leur rôle fonctionnel en tant que sites importants du métabolisme du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces organites varient remarquablement selon le type et l'environnement de la cellule, et peuvent avoir différentes formes et fonctions [23]. Initialement considérés comme une déchèterie cellulaire, les peroxysomes constituent réellement des organites actifs impliqués dans plusieurs processus cellulaires, qui vont de la régulation à la réponse cellulaire aux conditions de stress (xénobiotiques, cadmium, peroxyde d'hydrogène) [24]. La β -oxydation des acides gras reste une des fonctions les plus conservées chez tous les organismes, de la levure à l'Homme [25] et constitue la source principale de production d' H_2O_2 au niveau des peroxysomes. Une autre espèce de ROS produite dans ces organites est l'ion radicalaire superoxyde $O_2^{\bullet-}$. Deux sources de production de superoxyde ont été identifiées, la première se situe dans la matrice peroxysomale et s'agit de la xanthine oxydase qui catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique [26]. La deuxième source de superoxyde est associée à la membrane peroxysomale, et plus spécifiquement au niveau de la chaîne de transport d'électrons du peroxysome où trois polypeptides membranaires du peroxysome ou PMP (PMP18, PMP29 et PMP32) ont été identifiés comme sources de $O_2^{\bullet-}$ [27]. Etant donné que le peroxysome constitue un environnement très oxydant menant à la génération de ROS, cet organite est doté tout comme la mitochondrie d'un système d'élimination des ROS qui comprend plusieurs enzymes dont la superoxyde dismutase, la catalase, la peroxyrédoxine et la glutathion peroxydase.

I.2.2.3 Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est l'organite cellulaire où s'effectue principalement la maturation des protéines. Ceci comprend leurs repliements, leurs translocations et l'acquisition de modifications post-traductionnelles, tous indispensables à leurs fonctionnements. Dans le cas du repliement oxydatif, des ponts disulfure sont formés entre les résidus cystéines participant ainsi à l'établissement de la structure tridimensionnelle de la protéine, dite structure tertiaire. Cette opération est accomplie par l'action de la protéine disulfure isomérase (PDI) qui oxyde les résidus cystéines concernés. La PDI est régénérée

par l'oxydoréductase-1 du réticulum endoplasmique (ERO1), l'oxygène étant l'accepteur final d'électrons, générant ainsi du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

I.2.2.4 Les membranes

Les nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydases ou **NOX** sont une famille de protéines qui constitue la source de ROS relative aux **membranes cellulaires**. Tous les membres de la famille des NADPH oxydases sont des protéines transmembranaires qui transportent les électrons à travers les membranes biologiques pour réduire l'oxygène en superoxyde [28]. Les NOX des phagocytes constituent le premier exemple de système générant des ROS, non pas en tant que sous-produits mais en tant que fonction primaire impliquée dans la défense immunitaire. Chez les mammifères, 7 membres de cette famille ont été identifiés : NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2. La majorité des NADPH oxydases est localisée au niveau de la membrane cytoplasmique. NOX2 est le prototype de NADPH oxydase, son activité a été extensivement étudiée, elle est connue pour sa localisation au niveau des granules spécifiques des granulocytes [29], [30] ainsi que sa translocation à la surface de la cellule [31]. D'autres études suggèrent des localisations intracellulaires pour NOX1, spécifiquement au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique [32]. La NOX4, décrite dans la mitochondrie, le noyau et le réticulum endoplasmique, est caractérisée par la production de H_2O_2 , contrairement aux autres membres de cette famille qui produisent l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ [33]. Le Tableau 1 résume la localisation des différents membres de cette famille de protéines [34].

Tableau 1 - Membres de la famille des NADPH oxydases et leur localisation cellulaire [34].

<i>NOX</i>	<i>Localisation principale</i>	<i>Membrane</i>
NOX1 (MOX)	Colon	Membrane cytoplasmique
NOX2	Neutrophiles	Vacuole des phagocytes
	Cerveau	Réticulum endoplasmique
	Endothélium	
NOX3	Oreille interne	Non déterminé
	Foie	
NOX4	Rein	Endomembrane
	Endothélium	
	Ostéoclastes	
	Chondrocytes	
	Cerveau	
NOX5	Spermatocytes	
	Rate	Non déterminé
	Ganglion lymphatique	
DUOX1	Thyroïde	
	Cellules épithéliales	Surface
	Colon	
DUOX2	Thyroïde	
	Cellules épithéliales	Surface
	Colon	

La famille des **ECTO-NOX** décrite par Morré et al. (initialement décrites comme des NADH oxydases et nommées ainsi pour leur localisation à la surface de la cellule) joue un rôle dans la génération des ROS relatifs à la membrane plasmique chez les mammifères. Elle est impliquée, entre autre, dans l'oxydation des lipoprotéines circulantes [35].

I.2.2.1 Autres enzymes produisant des ROS

L'activité de certaines enzymes peut constituer une source additionnelle de ROS au niveau de la cellule. Parmi ces enzymes figurent :

- Les **cytochromes P450**
- Les **oxyde nitrique synthases**

- Les **lipoxygénases (LOX)**, les **cyclo-oxygénases (COX)** et les **phospholipases A2** (impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique)

Les cytochromes P450 constituent une superfamille d'enzymes qui activent le dioxygène et effectuent des réactions de monooxygénation de plusieurs composés tels que les acides gras, les stéroïdes, les eicosanoïdes, les rétinoïdes et les acides aminés. Ces réactions mènent à la production de $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 [36].

Les oxyde nitrique synthases sont des protéines qui catalysent la production de monoxyde d'azote jouant le rôle de vasodilatateur et d'anti-inflammatoire à partir de l'arginine. Lorsque ces enzymes sont découplées de leurs cofacteurs (l'arginine et la tétrahydrobioptérine) la réaction catalysée est déplacée vers la production de ROS sous la forme d'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ plutôt que le monoxyde d'azote [37].

Les COX sont impliquées dans la biosynthèse des prostaglandines, une famille diverse d'hormones autocrines et paracrines responsables de la médiation de plusieurs processus physiologiques cellulaires. Deux isoformes sont connues, la COX-1 et la COX-2, et se trouvent toutes les deux à la surface luminaire du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire [38]. Durant l'activité des COX, des radicaux peroxydes $ROO^{\bullet-}$ sont formés, ces espèces sont une source d'oxygène activé et peuvent directement mener à l'oxydation d'autres molécules [39].

Les LOX sont des dioxygénases qui oxydent les acides gras polyinsaturés au niveau de sites spécifiques de la chaîne carbonée générant des dérivés hydroperoxylés à doubles liaisons. Ces métabolites oxydés peuvent mener à un changement de l'équilibre redox intracellulaire [40].

Les phospholipases A2 sont des enzymes qui clivent les acides gras des phosphoglycérides. Les phospholipases A2 sont impliquées dans la génération de ROS surtout quand l'acide gras libéré est l'acide arachidonique par son activation des LOX et des COX [41].

Outre les ROS générés directement par les LOX, COX et phospholipases A2, ces enzymes participent également à la génération de ROS via le rôle que jouent leurs métabolites (surtout les métabolites de l'acide arachidonique) dans l'activation des NOX [42].

I.2.2.2 Les sources exogènes de ROS

Aux sources endogènes relatives aux différentes composantes cellulaires s'ajoute un nombre de facteurs externes qui contribuent à la génération des ROS. Parmi ces facteurs, nous comptons :

- L'exposition aux radiations ionisantes (UV, γ)
- L'exposition à des métaux lourds capables de générer des ROS
- L'exposition à des chocs thermiques
- L'exposition à certains polluants environnementaux et pesticides
- La fumée de cigarette, les solvants industriels et autres [43], [5].

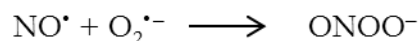
I.3 Les autres espèces réactives

Outre les ROS, d'autres dérivés réactifs contenant d'autres éléments chimiques peuvent eux aussi avoir des effets cytologiques et physiologiques importants lorsque l'équilibre impliquant ces espèces est rompu. Tout comme les ROS, ces espèces ont leurs sources, leurs cibles et leurs mécanismes d'élimination. Les plus connus sont les dérivés réactifs de l'azote ou RNS (*Reactive Nitrogen Species*). L'importance accordée à l'étude du déséquilibre de ces espèces lui a valu son propre nom, le stress nitrosatif.

I.3.1 Les RNS : les dérivés réactifs de l'azote

Le monoxyde d'azote (ou l'oxyde nitrique) **NO[•]** est le principal dérivé réactif d'azote, non seulement parce que c'est le RNS majoritaire produit par la cellule, mais également parce qu'il constitue la source principale de génération d'autres RNS. Le monoxyde d'azote est un radical libre, à courte durée de vie (de l'ordre de la seconde) [44], connu pour son rôle en tant que vasodilatateur et neurotransmetteur. Le monoxyde d'azote joue d'autres rôles également, notamment en tant que régulateur dans le système immunitaire [45]. La production de NO[•] est catalysée par l'oxyde nitrique synthase. Trois isoformes de cette protéine existent chez les mammifères.

Même si le monoxyde d'azote joue un rôle important à des concentrations physiologiques, son accumulation ou sa production à des concentrations qui dépassent la capacité de la cellule à l'éliminer mène au stress nitrosatif. En effet, l'oxyde d'azote réagit avec l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ pour produire l'ion peroxynitrite **ONOO⁻** selon :



Le peroxynitrite est un agent puissant d'oxydation et de nitration. Comme sa production augmente en présence d'excès de superoxyde, on associe souvent les deux phénomènes de stress oxydatif et de stress nitrosatif. Ce lien provient également de la génération de ROS par l'oxyde nitrique synthase évoquée plus tôt.

D'autres RNS sont obtenus également par oxydation du monoxyde d'azote en dioxyde d'azote NO_2^\bullet puis en N_2O_3 , le trioxyde d'azote. Le Tableau 2 présente les membres de cette famille d'espèces réactives ainsi que les molécules à partir desquelles ils sont formés. Les ions nitrates, considérés comme non toxiques, ne font pas partie de cette famille [46], [44].

Tableau 2 - Les dérivés réactifs d'azote principaux et leur formation [46]

<i>Nom</i>	<i>Formule</i>	<i>Formation</i>
Oxyde nitrique	NO^\bullet	Formation catalysée par l'oxyde nitrique synthase à partir d'arginine et NADPH
Trioxyde d'azote	N_2O_3	A partir de NO^\bullet et O_2^\bullet
Nitrite	NO_2^-	A partir de NO^\bullet
Peroxynitrite	ONOO^-	NO^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$
Dioxyde d'azote	NO_2^\bullet	Décomposition de ONOO^-
Anion nitrosoperoxycarbonate	ONOOCO_2^-	ONOO^- et CO_2
Cation nitronium	NO_2^+	Décomposition de ONOOCO_2^-
Nitroxyle	HNO	Réduction de NO^\bullet
Chlorure de nitryle	Cl-NO_2	NO_2^- et HOCl
S-nitrosothiols	RSNO	Addition covalente de NO^\bullet à une cystéine

I.3.2 Les RSS : les dérivés réactifs du soufre et du sélénium

Comme l'oxygène, le soufre et le sélénium font partie du groupe 16 du tableau périodique des éléments, ou les chalcogènes. Cependant, le soufre et sélénium ont accès à des états d'oxydation positifs supérieurs allant jusqu'à +6, ce qui explique la complexité du comportement redox de ces éléments. Le soufre et le sélénium jouent un rôle biologique important et sont présents aussi bien dans les protéines que dans des molécules à faibles

poids moléculaires. Le terme RSS (*Reactive Sulfur Species*) a été introduit par Jacob et al. [47]. Ces espèces concernent surtout les radicaux thiyles RS^\bullet (oxydants forts) et les disulfures R_2S_2 (oxydants moyens) formés essentiellement par exposition des biomolécules contenant du soufre aux ROS et au peroxydant. Les radicaux thiyles sont très instables et forment toute une cascade de composés radicalaires contenant du soufre et de l'oxygène. Le Tableau 3 contient quelques-unes des espèces qui ont été identifiées ainsi que des espèces radicalaires pouvant se former à partir de l'ion sulfite SO_3^{2-} .

Tableau 3 - Les espèces radicalaires contenant du soufre et leurs sources possibles [47].

<i>Nom</i>	<i>Formule</i>	<i>Sources possibles</i>
Radical thiyle	RS^\bullet	ROS, $\text{R}^\bullet + \text{glutathion (GSH)}$
Radical anion disulfure	$(\text{RSSR})^{\bullet-}$	$\text{RS}^\bullet + \text{GSH}$
Radical perthiyle	RSS^\bullet	RSH
Radical sulfinyle	RSO^\bullet	RSOH
Radical sulfonyl	RS(O)_2^\bullet	RS(O)OH
Radical thiyle peroxy	RSOO^\bullet	$\text{RS}^\bullet + \text{O}_2$
Radical sulfonyl peroxy	$\text{RS(O)}_2\text{OO}^\bullet$	$\text{RS(O)}_2^\bullet + \text{O}_2$
Radical anion trioxyde de soufre	$\text{SO}_3^{\bullet-}$	SO_3^{2-}
Radical anion pentoxyde de soufre	$\text{SO}_5^{\bullet-}$	$\text{SO}_3^{\bullet-} + \text{O}_2$

Le sulfure d'hydrogène H_2S (réducteur) impliqué dans diverses fonctions de signalisation cellulaire et le sélénure d'hydrogène H_2Se (réducteur fort) sont considérés également comme des RSS puisqu'ils interagissent avec les protéines et affectent leurs fonctions [48].

I.3.3 Les RCS : les dérivés réactifs du chlore

La famille des dérivés réactifs du chlore (*Reactive Chlorine Species*) concerne essentiellement l'acide hypochloreux HOCl . Cet acide est un oxydant puissant, utilisé comme désinfectant et agent de blanchiment et constitue la substance active de l'eau de Javel [49]. Compte tenu de ses propriétés désinfectantes et bactéricides, l'acide hypochloreux est produit dans les phagosomes des granulocytes neutrophiles durant la réponse immunitaire tout comme l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. L'acide hypochloreux joue cependant un rôle plus important dans la défense immunitaire par les phagocytes, étant

donné que les ROS nécessitent une présence à des concentrations plus élevées et des temps plus longs pour avoir le même effet.

La production d'acide hypochloreux commence par la production de ROS par les NADPH oxydase (la NOX 2 spécifiquement). Cette étape mène à la production d'ion superoxyde et H_2O_2 . Une enzyme, la myeloperoxydase, catalyse ensuite la réaction de production d'acide hypochloreux à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ions chlore Cl^- (mais également d'autres halogènes tel que le Br^- pour donner l'acide hypobromeux HOBr).

L'acide hypochloreux agit sur un nombre important de biomolécules, notamment les protéines au niveau des résidus cystéine, histidine, tryptophane et méthionine. Plusieurs de ces réactions sont irréversibles et mènent à l'agrégation et la dégradation des protéines. L'acide hypochloreux agit également sur les amines primaires et secondaires pour former des chloramines, qui sont eux-mêmes capables d'oxyder d'autres biomolécules [50].

I.3.4 Les espèces contenant du carbone

L'anion nitrosoperoxycarbonate $ONOOCO_2^-$ évoqué plutôt est un dérivé réactif d'azote généré à partir d'un autre RNS, le peroxydinitrite, et le CO_2 . L'anion nitrosoperoxycarbonate peut se décomposer ensuite par scission homolytique pour produire le dioxyde d'azote NO_2^\bullet et l'anion radical $CO_3^{\bullet-}$. Le $CO_3^{\bullet-}$ est moins réactif que le radical hydroxyle HO^\bullet , cependant il est plus stable et peut donc diffuser à partir de son site de génération pour engendrer des réactions radicalaires ailleurs [51].

I.4 Stress oxydatif ou homéostasie redox ?

La découverte d'espèces radicalaires dans les systèmes biologiques et ensuite l'introduction des ROS en tant que famille qui regroupe toutes ces espèces réactives furent des événements marquant dans la compréhension du fonctionnement cellulaire. Ces découvertes, ainsi que l'intérêt qu'elles ont suscité, ont mené à l'introduction du concept du stress oxydatif en biologie. Très vite, la recherche s'est focalisée sur les effets délétères que peuvent avoir ces espèces au vu de leur réactivité et leur pouvoir oxydant. Effectivement, les dégâts engendrés par les ROS ont été constatés au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides, entre autres. Cependant, l'existence dans l'organisme même de sources générant des ROS a soulevé également la question de l'intérêt que peuvent avoir ces espèces. Oxydants ou seconds messagers ? Dénaturants ou agents de défense immunitaire ? Les ROS sont souvent décrits dans la littérature comme une vraie incarnation de « *The Good, The Bad and The Ugly* » [52] (Le Bon, la Brute et le Truand)... réunis en un !

I.4.1 Quels dégâts résultent du stress oxydatif ?

I.4.1.1 Les protéines

Compte tenu de leur abondance cellulaire, il est estimé que les protéines représentent à peu près 68% des espèces subissant l'effet oxydant des ROS. Ces chiffres se basent également sur les vitesses et constantes de réaction bien connues de plusieurs dérivés réactifs, ne prenant néanmoins pas en compte d'autres facteurs tels que la vitesse de réparation du type de biomolécule affectée par le stress oxydatif. Ces estimations restent une très bonne indication de l'importance des protéines en tant que cibles des ROS [53].

L'effet des ROS sur les protéines concerne aussi bien les chaînes latérales que le squelette peptidique. Et si les espèces les moins réactives montrent une sélectivité pour les chaînes latérales, les dérivés les plus réactifs (radicaux hydroxyles HO[•]) présentent une réactivité comparable envers les deux parties de la structure protéique.

En considérant les acides aminés constitutifs d'une protéine, nous pouvons distinguer les modifications spécifiques à un acide aminé d'une part, des modifications globales qui peuvent affecter la majorité des acides aminés d'autre part. L'ajout d'un groupement carbonyle sur la chaîne latérale ou principale est un exemple de modification globale qui a été considérée par conséquent comme marqueur d'oxydation des protéines [54]. Quant aux modifications spécifiques, la cystéine constitue l'un des résidus les plus réactifs. La méthionine, la proline, ainsi que les acides aminés aromatiques (histidine, tyrosine et tryptophane) figurent également parmi les acides aminés susceptibles de subir les effets d'un stress oxydatif.

Par son groupement thiol –SH, la cystéine est intrinsèquement un des acides aminés les plus nucléophiles. C'est un résidu relativement rare au niveau du protéome qui se trouve néanmoins souvent au niveau du site fonctionnel d'une protéine. La majorité des modifications sur cet acide aminé sont des modifications réversibles, ce qui souligne son rôle dans les fonctions de régulation et de signalisation. Les résidus cystéines jouent également un rôle structural important en maintenant (ou en modifiant) la structure tertiaire (ou structure tridimensionnelle) des protéines via les ponts disulfure (-S-S-) entre 2 cystéines, ainsi que les liaisons de coordination avec les métaux tel que le fer dans les clusters Fe-S. La chimie du groupement thiol est une chimie assez riche et comprend une multitude de formes oxydées. Parmi ces formes nous comptons l'oxydation en acide sulfénique –SOH, peu stable et pouvant réagir assez rapidement avec un groupement thiol de la même protéine pour former

un pont disulfure intramoléculaire, ou un pont disulfure intermoléculaire dans le cas de réaction avec un résidu cystéine d'une autre protéine. Les réactions avec des thiols ne faisant pas partie d'une protéine sont possibles aussi, ceci est le cas de la S-gluthationylation (R-S-S-GSH) et de la S-cystéinylation (R-S-S-Cys) résultant d'une réaction avec une molécule de glutathion ou une cystéine libre respectivement. Les réactions avec d'autres dérivés réactifs mènent à la formation d'autres formes modifiées telles que les formes nitrosylées –SNO (par réaction avec les dérivés réactifs de l'azote RNS) et les formes chlorées –SCl (par réaction avec les dérivés réactifs du chlore). Toutes ces formes constituent des modifications réversibles qui peuvent être réduites par un nombre d'enzymes telles que les thiorédoxines. Un nombre d'isomérases permet également de réduire et reformer les ponts disulfure jusqu'à retrouver la bonne configuration. Les résidus –SOH peuvent subir des réactions de suroxydation menant à la formation d'acides sulfinique –SO₂H et sulfonique –SO₃H, modifications typiquement irréversibles. Seuls certains eucaryotes possèdent une enzyme, la sulfirédoxine, permettant de réduire l'acide sulfinique [55].

Les résidus méthionine sont également très sensibles aux effets des ROS et peuvent subir des réactions d'oxydation menant à la formation du radical cation méthionine ou de la méthionine sulfoxyde. La méthionine sulfoxyde réductase permet de réduire la méthionine sulfoxyde [56]. Tout comme la cystéine, la méthionine peut subir des réactions irréversibles de suroxydation menant à la formation des groupements méthionine sulfone et méthionine sulfoximine (structures semi-développées à la Figure 5).

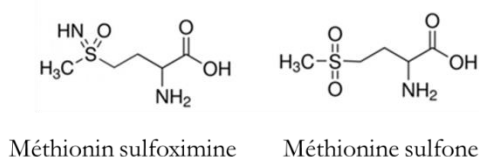


Figure 5 - structures semi-développées de la méthionine sulfone et de la méthionine sulfoximine.

Les autres acides aminés sont susceptibles de réagir avec les ROS mais avec des vitesses de réactions inférieures à celles avec la cystéine et la méthionine, ces réactions comprennent l'oxydation des histidines et la formation de dityrosine. Certaines de ces réactions sont irréversibles.

L'effet du stress oxydatif sur une protéine émane de l'effet des ROS sur les acides aminés qui la constituent. Il en résulte que ces effets comprennent la perte de la structure secondaire et tertiaire de la protéine (repliement, dépliement de la protéine, inactivation des protéines fer-soufre par décooordination du fer, etc.) et par conséquent un changement ou

une perte de son activité, de sa stabilité et de sa solubilité. L'oxydation des protéines peut mener à leur dégradation ou leur agrégation. Une protéine peut être clivée et générer des produits de plus faible poids moléculaire mais peut également subir des réactions de réticulation menant à des produits de poids moléculaire plus élevé. Les protéines non réparables sont ciblées pour une dégradation par différentes enzymes ou complexes tels que les calpaïnes et les protéasomes. Certaines protéines modifiées ne sont ni réparables, ni dégradables et s'accumulent donc au niveau des cellules ou des tissus. La classification des modifications générées par l'oxydation des protéines s'effectue en général en se basant sur ces différentes caractéristiques, mais il n'existe pas de principe unique pour la classification [57].

I.4.1.2 L'ADN

L'ADN constitue une autre cible des ROS. Les radicaux hydroxyles HO^\bullet peuvent oxyder aussi bien les bases azotées que les unités désoxyriboses de la chaîne principale, affectant les interactions protéine-ADN et menant également à des cassures simple et double brin [58]. Parmi les quatre bases azotées, la guanine a le potentiel d'oxydation le plus bas ; elle est donc la plus susceptible de subir les effets d'un stress oxydatif. Ces effets incluent des réactions d'oxydation, nitration, halogénéation et alkylation [59]. La 8-oxoguanine (Figure 6) est un des produits d'oxydation les plus fréquents. Cette modification est particulièrement pernicieuse puisque la 8-oxoguanine peut s'apparier à l'adénine et échapper au système de reconnaissance de mésappariements des ADN polymérases [60].

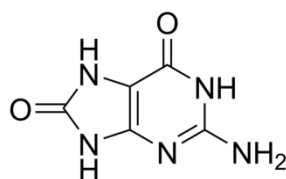


Figure 6 - structure semi-développée de la 8-oxoguanine

L'ADN mitochondrial est spécifiquement susceptible aux dégâts du stress oxydatif vu sa proximité avec la chaîne de transport d'électrons, source principale de ROS dans la mitochondrie. Il est estimé que le niveau d'oxydation des bases azotées de l'ADN mitochondrial peut être 10 à 20 fois plus élevé que le niveau d'oxydation des bases azotées dans l'ADN nucléaire [61].

La mort cellulaire et la mutagenèse sont des résultats directs des lésions de l'ADN causées par les ROS. Les mutations sont impliquées dans divers cas pathologiques tels que les cancers et les maladies neurodégénératives, ainsi que des processus biologiques normaux

tel que le vieillissement. Afin de combattre les effets des lésions de l'ADN, les cellules sont dotées de mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN permettant de détecter ces lésions, les signaler et gérer leurs réparations. La détection des lésions se fait par un nombre d'enzymes spécialisées comme les glycosylases, alors que la réparation se fait par d'autres enzymes comme les nucléases et les ligases. Les mécanismes de réparation dépendent du type de lésion et comprennent plusieurs voies dont la réparation par excision de base et la réparation par excision de nucléotide [62].

I.4.1.3 Les lipides

La peroxydation des lipides est un phénomène bien connu et étudié depuis la découverte des lipoxygénases et des cyclo-oxygénases. A ces voies viennent s'ajouter deux voies non enzymatiques : la peroxydation par les radicaux libres et la peroxydation par voie non radicalaire, deux voies qui suscitent beaucoup d'intérêt vu leur implication dans les phénomènes de stress oxydatif. Le radical hydroxyle HO^\bullet est un des dérivés capables d'initier des réactions de peroxydation par voie radicalaire alors que l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ et l'ozone constituent des exemples de molécules initiant la peroxydation non radicalaire.

Riches en lipides, les membranes cellulaires sont une cible des ROS. L'abstraction d'un hydrogène par ces espèces initie la réaction menant à la formation de hydroperoxydes lipidiques LOOH. Ces hydroperoxydes peuvent se décomposer pour générer des radicaux alkoxyloxy LO^\bullet et peroxyloxy LOO^\bullet , espèces capables de propager la réaction d'oxydation à d'autres biomolécules telles que les protéines et l'ADN [63]. Les produits des réactions de peroxydation sont assez complexes et comprennent des aldéhydes ainsi que des produits de polymérisation à effets cytotoxiques. Les membranes neuronales étant riches en acides gras polyinsaturés, l'implication des ROS a été étudiée dans le cadre de plusieurs maladies neurodégénératives. Le rôle des ROS est également établi dans l'oxydation des lipides dans les lipoprotéines, ces lipides oxydés peuvent ensuite oxyder les résidus aminés de la composante apolipoprotéine [64].

Les cellules sont dotées de systèmes de réduction des hydroperoxydes lipidiques composés de différentes enzymes telles que les glutathion peroxydases. La vitamine E (tocophérols et tocotriénols) est également un antioxydant lipophile permettant d'éliminer les produits radicalaires des réactions de peroxydation des lipides.

I.4.1.4 Les petites molécules

La réactivité des ROS n'est pas limitée aux protéines, lipides et l'ADN. Ces espèces interagissent également avec les petites molécules présentes dans les cellules. De petites molécules lipidiques telles que le cholestérol subissent l'effet oxydant des ROS, notamment les espèces radicalaires et l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$. Les hydroperoxydes de cholestérol résultant de ces réactions d'oxydation sont connus pour leur résistance à la détoxification par les voies enzymatiques glutathion-dépendantes et peuvent donc s'accumuler [65].

Un nombre d'autres petites molécules antioxydantes sont concernées également par les effets des ROS. Notamment le glutathion (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine), GSH, est un antioxydant connu pour son rôle en tant que tampon redox dans les cellules. Son résidu cystéine peut subir des réactions d'oxydation comme les résidus cystéines des protéines. Ainsi, l'oxydation du glutathion peut mener à l'oxydation du groupement thiol en acide sulfénique GSOH, qui peut réagir avec une autre molécule de glutathion pour donner le disulfure de glutathion GSSG. Le glutathion peut également subir des réactions de suroxydation menant à la formation de hydroperoxyde GSOOH ou des réactions de nitrosylation avec le monoxyde d'azote NO^\bullet pour donner le S-nitrosoglutathion GSNO [66].

D'autres antioxydants exogènes, tel que l'ascorbate (Vitamine C), réagissent spontanément avec les dérivés réactifs de l'oxygène. La vitamine E mentionnée précédemment réagit également avec les dérivés réactifs et jouent un rôle dans leur élimination.

I.4.2 L'implication des ROS dans les pathologies et le vieillissement

Dès leur découverte dans les organismes vivants, les radicaux libres et les dérivés réactifs plus généralement, furent le sujet de recherches extensives portant sur leur implication dans le dysfonctionnement cellulaire et les pathologies. Ces effets émanent de la capacité des dérivés réactifs à réagir spontanément avec une grande gamme de biomolécules et à perturber leurs fonctions. Sachant que l'implication des dérivés réactifs dans chaque pathologie ou dysfonctionnement représente un domaine d'étude à part entière, cette partie sera limitée à de brèves descriptions des cas les plus étudiés.

I.4.2.1 Les cancers

Les cancers représentent un nombre de pathologies à complexité assez élevée quant aux facteurs impliqués et aux stades observés (initiation, promotion et progression) ainsi que les modifications moléculaires liées à chaque stade. La contribution du stress oxydatif par

différents biais à l'oncogenèse a longuement été étudiée. Parmi ces biais figurent les modifications moléculaires engendrées par les ROS ainsi que la stimulation des voies de signalisation menant à l'activation de facteurs de transcriptions pro-tumoraux [67].

Le caractère oncogène du stress oxydatif peut être attribué à la génotoxicité des ROS. Ces espèces peuvent réagir avec les pyrimidines et les purines ainsi que les protéines associées à l'ADN causant une modification des bases azotées et une instabilité génomique. Ces perturbations mènent souvent à des mutations et à la modification de l'expression génétique. Les dégâts causés à l'ADN, tels que les cassures simple et double brin et les modifications des bases azotées, sont fortement impliqués dans le stade d'initiation de certains cancers. Des lésions de l'ADN, telles celles provoquées par l'oxydation de la guanine en 8-oxoguanine, ont été trouvées dans différents stades de cancer [68].

Le rôle des ROS dans la modulation de l'expression génétique et son implication dans les cancers ont été également étudiés. Le système Nrf2-Keap1 est un système hautement conservé et un des plus investigués. Se liant aux éléments de réponse ARE (*Antioxidant Response Element*), le facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) promeut l'expression d'un grand nombre d'enzymes protectives à effet antioxydant, telles que la glutathion réductase, les peroxyrédoxines et la thiorédoxine. Dans les conditions basales, Nrf2 est lié à la protéine Keap1 (*Kelch ECH associating protein 1*) et son activité est donc inhibée. Dans des conditions de stress oxydatif, les cystéines catalytiques de Keap1 forment des ponts disulfure intermoléculaires perturbant l'interaction Nrf2-Keap1 et menant à la translocation de Nrf2 au noyau et l'activation de la défense antioxydante. Une baisse de l'activité de Nrf2 est accompagnée d'une augmentation de la production de ROS. Cependant, dans certains cas, comme le cas des cellules cancéreuses, des niveaux élevés de l'activité de Nrf2 participent à l'évolution du cancer en promouvant la survie de ces cellules et bloquant l'apoptose [69], [70].

I.4.2.2 Les maladies cardiovasculaires

Les ROS sont capables d'induire des modifications post-traductionnelles au niveau des protéines. Trois grands groupes de protéines, essentielles au fonctionnement du cœur, peuvent être affectés par les ROS qui modifient leur conformation, leur stabilité, leur activité et leurs interactions avec d'autres protéines. L'oxydation et la nitrosylation des protéines contractiles peuvent jouer un rôle dans la baisse de l'activité cardiaque. Les phosphatases et les kinases impliquées activement dans les fonctions de signalisation des cellules musculaires subissent également les effets du stress oxydatif. Etant donné que la signalisation passe par la

voie de modifications post-traductionnelles, la phosphorylation dans ce cas, les modifications apportées par les ROS peuvent perturber le fonctionnement de ce groupe de protéines. Le troisième groupe de protéines est celui des protéines impliquées dans les fonctions de transcription de l'ADN, qui comptent non seulement les facteurs de transcription, mais également les histones [71].

D'un autre côté, la majorité des maladies cardiovasculaires est le résultat direct de l'athérosclérose. L'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) et puis leur transfert de la lumière des vaisseaux à la media (tunique entre les couches intérieure et extérieure de la paroi du vaisseaux) sont considérés comme les éléments initiateurs de l'athérosclérose [72].

I.4.2.3 Les maladies neurodégénératives

Le terme « maladies neurodégénératives » est un terme générique pour désigner un ensemble de maladies qui atteignent le cerveau et qui sont caractérisées par une dégénérescence progressive des cellules nerveuses. Le système nerveux est un organe très actif métaboliquement, requérant à peu près 20% de l'énergie de l'organisme. Cette énergie provient des mitochondries, sites importants de production de ROS. D'autre part, le système nerveux est riche en acides gras polyinsaturés, susceptibles de se dégrader suite à un stress oxydatif. Ceci a des conséquences directes sur la stabilité des membranes et donc la viabilité des cellules.

Les lésions de l'ADN mitochondrial, la peroxydation des acides gras et les dysfonctionnements d'enzymes telles que le NADPH oxydases (NOX, source de ROS) et glutathion transférase (élimination des ROS) ne représentent que quelques exemples de l'implication du stress oxydatif dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson [73], [74], [75].

I.4.2.4 Le vieillissement

Problématique éternelle, le vieillissement a été depuis toujours un sujet étudié aussi bien par les scientifiques que par les philosophes. Le vieillissement est un processus multifactoriel caractérisé par une dégradation des fonctions physiologiques au cours du temps. Il se manifeste par une accumulation de diverses déficiences et une baisse de la capacité à les réparer. Parmi les facteurs impliqués dans le vieillissement nous comptons l'oxydation des protéines (par exemple l'augmentation de la carbonylation qui a été utilisée comme marqueur de vieillissement), le dysfonctionnement des mitochondries (accumulation

des lésions et mutations de l'ADN mitochondrial avec l'âge, baisse de la capacité de réparation et d'élimination des protéines oxydées et agrégées), etc. [76].

I.4.3 ROS signalisation/défense immunitaire

Durant toute leur vie, les organismes doivent faire face à différents types de menaces pouvant créer des dégâts au niveau des cellules et/ou des organes vitaux. Les dérivés réactifs font partie de ces menaces. Un intérêt s'est vite développé pour comprendre leurs effets délétères et caractériser les mécanismes de réponse que les organismes ont développés pour réduire et réparer les dégâts. Cependant, la découverte de sources de ROS dans ces organismes a suscité un questionnement sur l'intérêt que peuvent avoir ces espèces. Le paradigme s'est ainsi déplacé d'une notion de simple présence nocive vers une notion d'équilibre. L'intérêt pour l'implication des ROS dans la réponse immunitaire, les processus inflammatoires et le contrôle d'autres processus cellulaires a ainsi rejoint l'intérêt pour les ROS en tant qu'agents nocifs comme le montre la Figure 7 [77].

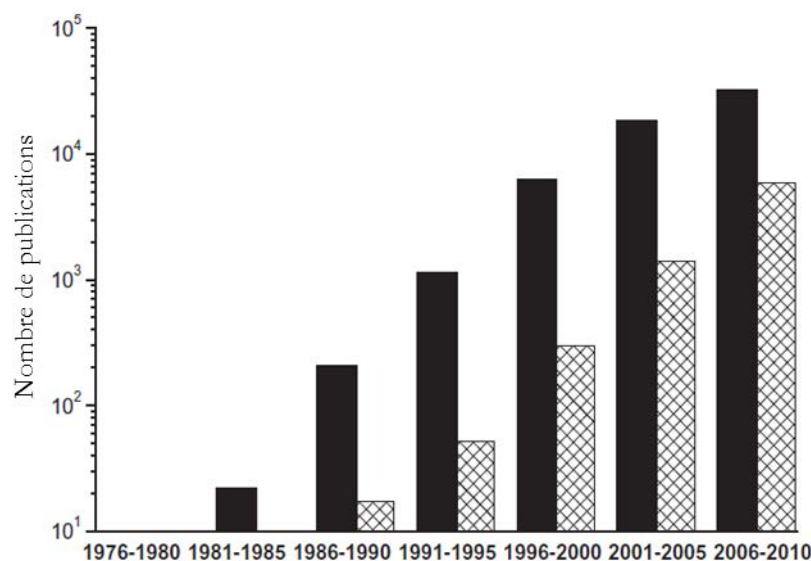


Figure 7 - Nombre d'articles traitant la thématiques des ROS dans le cadre de la lésion des tissus (colonnes noires) comparé au nombre d'articles traitant le rôle des ROS dans la signalisation (colonnes hachurées)[77]

I.4.3.1 La signalisation redox

La notion d'interrupteur moléculaire (*molecular switch*) a été introduite en biologie avec la découverte de la phosphorylation/déphosphorylation en tant que voie de signalisation. Plus récemment, le rôle des ROS en tant que seconds messagers a suscité l'intérêt des chercheurs. Ainsi, le concept d'interrupteurs redox s'est développé. Ceci concerne surtout les

protéines et spécifiquement certains résidus cystéines particulièrement sensibles aux conditions redox qui règnent dans une cellule. En effet, la cystéine est réactive grâce au groupement thiol -SH de sa chaîne latérale. Le pKa d'une cystéine libre (Figure 8) est de 8,4. Une cystéine est réactive lorsqu'elle est sous forme déprotonée -S⁻ (thiolate), sachant que le pKa d'une cystéine peut varier entre 4 et 10 selon son environnement d'acides aminés au sein de la protéine. Ceci implique une large gamme de réactivité de ces résidus et donc des rôles fonctionnels et structuraux variés.

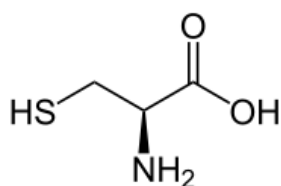


Figure 8 - Formule semi-développée de la L-cystéine

La vie microbienne s'est développée sur la terre il y a 3,6 milliards d'années dans des conditions d'anaérobie. L'oxygène, par ses propriétés oxydantes, représentait une menace pour ces organismes qui ont développé des systèmes d'élimination des espèces oxydantes. Il est intéressant de noter que les résidus cystéines représentaient moins de 1% des acides aminés du protéome de ces organismes [78]. L'atmosphère s'est enrichie en oxygène il y a 900 millions d'années (événement connu sous le nom de la Grande Oxydation) sous l'action des cyanobactéries. Cet événement catastrophique pour la vie anaérobique de certaines espèces a mené au développement d'autres organismes pouvant s'adapter aux nouvelles conditions. La proportion des cystéines dans le protéome de ces nouvelles formes de vie a augmenté pour atteindre 2,8%, reflétant ainsi non seulement le processus d'adaptation mais également un rôle plus important de la cystéine en tant qu'interrupteur redox avec les teneurs plus importantes de ROS (Figure 9) [78].

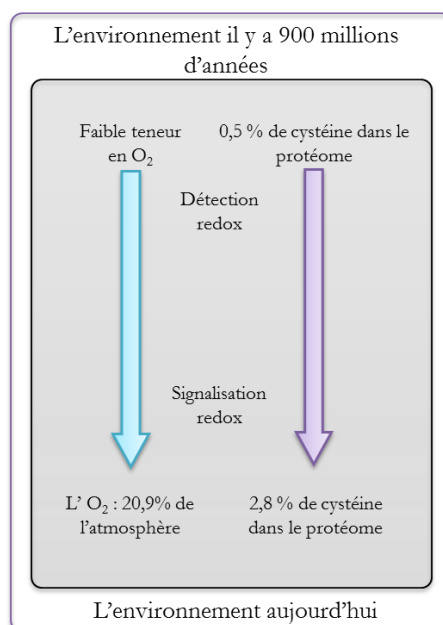


Figure 9 - Co-évolution des systèmes thiols avec la complexité biologique. Miseta et Czutora [79] ont démontré que le pourcentage de cystéine codé par les génomes a augmenté de 0,5% à plus de 2% en parallèle avec l'augmentation de la teneur en O₂ et l'évolution de la complexité biologique. Les cystéines sensibles aux conditions redox sont très conservées chez les organismes vivants. Image adaptée de l'article de DP Jones [78].

L'apoptose : un exemple de régulation redox.

La régulation du facteur de transcription Nrf2 décrite plus tôt est un exemple de régulation redox impliquée dans le cycle de survie/mort cellulaire. La régulation de la protéine ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*) en constitue un autre. ASK1 est une MAPKKK (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase*) qui mène à l'activation des voies de signalisation de JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) et de la MAP kinase P38, 2 voies responsables de la régulation de l'apoptose et de la réponse inflammatoire. ASK1 est activée par transduction de signal via la thiorédoxine-1. La thiorédoxine-1 est une protéine dont le site catalytique contient deux cystéines actives sensibles aux conditions redox. Dans les conditions basales, l'activité de ASK1 est inhibée par la thiorédoxine-1 réduite à laquelle elle est liée. L'oxydation de la thiorédoxine-1 mène à sa dissociation de ASK1 et l'activation des voies apoptotiques de JNK et P38 [80].

Un autre exemple de régulation par un système redox : le système MIA40-ERV1

Le transport des protéines, et des biomolécules en général, à travers la cellule passe souvent par des protéines (ou complexes protéiques) transmembranaires telles que les perméases. Dans le cas de la mitochondrie, les systèmes d'import des protéines à la membrane externe, à la membrane interne et à la matrice sont connus. Cependant le système d'import à l'espace inter-membranaire est resté inconnu jusqu'à la découverte du système

MIA40-ERV1 (*Mitochondrial Intermembrane space import and Assembly protein 40 - sulfhydryl oxidase Essential for Respiration and Viability 1*) [81]. Suite à son transport à travers la membrane externe de la mitochondrie par le complexe protéique TOM (*Translocase of Outer Membrane*), la protéine importée est reconnue par la forme oxydée de MIA40 (comportant un pont disulfure) (Figure 10). MIA40 transmet le pont disulfure à la protéine importée, permettant ainsi de lui conférer la conformation nécessaire pour son fonctionnement dans l'espace inter-membranaire. MIA40 ne forme cependant pas des ponts disulfure *de novo* mais agit comme une oxydoréductase qui transmet les ponts disulfures générés par ERV1. MIA40 est donc régénérée sous sa forme oxydée par ERV1 qui, à son tour, est régénérée par transfert d'électrons via le cytochrome c à la chaîne respiratoire [82].

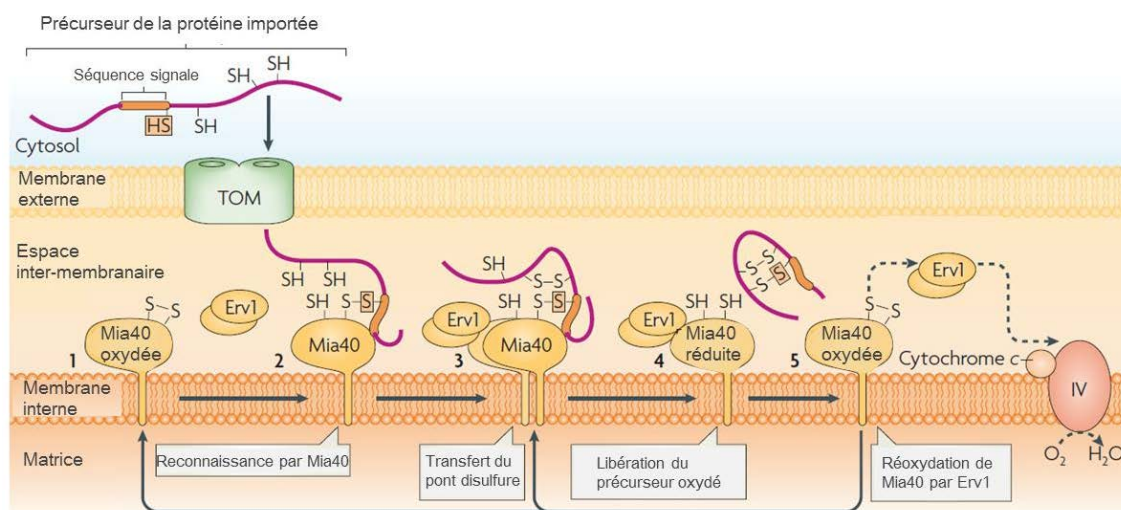


Figure 10 - Représentation schématique du fonctionnement du système de relais redox MIA40-ERV1 pour l'import de protéines à l'espace inter-membranaire de la mitochondrie [83].

I.4.3.2 Rôle des ROS dans la réponse immunitaire

Face aux menaces des pathogènes, les organismes vivants ont développé une variété de mécanismes de défense. Chez de nombreuses espèces, les ROS jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire innée et acquise.

Suite à l'exposition aux pathogènes, une production élevée de ROS est constatée chez les phagocytes activés. Cette production excessive de ROS, connue sous le nom de stimulation ou réponse oxydative (*Oxidative Burst*), est utilisée par les phagocytes pour tuer les pathogènes. La source principale de production des ROS microbicides chez les phagocytes est la NADPH oxydase 2 (NOX2). L'action de la NOX2 mène à la production d'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ permettant la production d'autres ROS, comme le H_2O_2 (par dismutation), le peroxydite $ONOO^-$ (par réaction avec le monoxyde d'azote) et l'acide hypochloreux

HOCl (par l'action de la myéloperoxydase). Les ROS participent également à l'activation des inflammasomes, complexes protéiques impliqués dans la réponse immunitaire innée.

Bien que rapide, cette réponse immunitaire innée n'est pas toujours suffisante et une réponse spécifique contre l'agent pathogène en question peut être nécessaire. La production de ROS par les phagocytes est maintenue puisqu'elle joue un rôle dans la réponse immunitaire acquise. En effet, les ROS jouent un rôle dans la transduction de signal participant à l'activation des lymphocytes T. Il a également été démontré que la production d'interleukine 2 par les lymphocytes T est augmentée par les ROS [40]. Les ROS sont impliqués également dans d'autres fonctions immunitaires telles que le recrutement des neutrophiles.

I.4.3.3 Le rôle des ROS dans la régénération et la différenciation

La réponse cellulaire aux lésions est un mécanisme multifactoriel hautement conservé qui comprend plusieurs processus complexes activant des voies de signalisation et des facteurs de transcription permettant d'effectuer la réparation. Les ions Ca^{2+} ainsi que l'ATP sont connus comme étant deux molécules messagères impliquées dans la réponse immédiate aux lésions. A ces deux molécules vient se rajouter le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Effectivement, les ions Ca^{2+} seraient impliqués dans l'activation des NADPH oxydases responsables de la production de ROS qui est observée suite à une lésion [34]. Les propriétés microbicides de certains ROS ainsi que leurs rôles dans le recrutement des cellules immunitaires et l'initiation de la réaction inflammatoire, mentionnés dans les paragraphes précédents, sont essentiels dans la réponse aux blessures. Le rôle des ROS ne s'arrête pas à ce stade puisqu'ils semblent être impliqués dans la transduction de signal permettant d'activer le processus de régénération des tissus. Ces études sont souvent menées sur le poisson zèbre (*Danio rerio*) ou les têtards d'amphibiens (*Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*) connus pour leur capacité à régénérer leur queue suite à une amputation. Ce processus de régénération implique des tyrosine kinases Src, médiateurs importants de la migration cellulaire et de la réparation épithéliale. L'activation de ces kinases via des résidus cystéines, présents dans leur domaine kinase, est H_2O_2 dépendante [84].

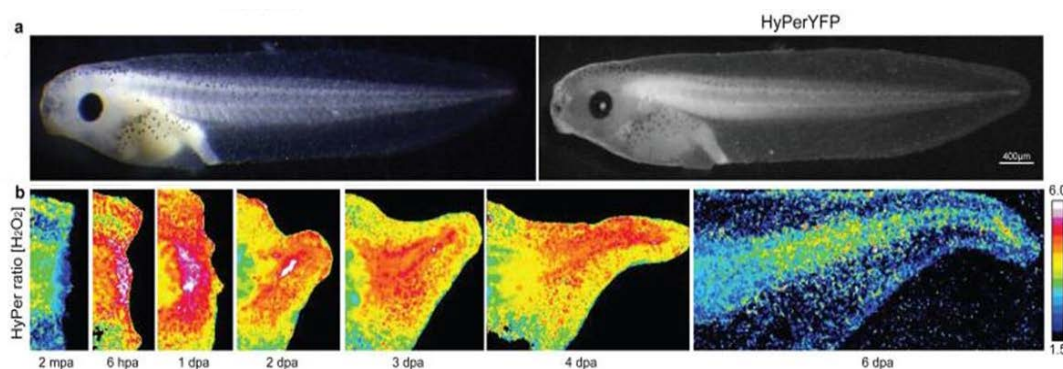


Figure 11 - Production de H₂O₂ durant la régénération de la queue d'un têtard de *Xenopus laevis*. (a) Les cadres montrent les images prises par microscopie en champ clair (gauche) et par fluorescence (droite) d'un têtard transgénique exprimant un senseur de H₂O₂, le HyPerYFP. (b) Les cadres montrent l'imagerie HyPerYFP représentant la concentration en H₂O₂ durant la régénération de la queue. La concentration en H₂O₂ est dérivée du rapport d'excitation de HyPerYFP490nm (forme oxydée)/HyPerYFP402nm (forme réduite). Abréviations – mpa : minute après l'amputation, hpa : heure après l'amputation, dpa : jour après l'amputation. Image adaptée de [85]

D'autre part, les ROS sont impliqués dans les processus de différenciation des cellules souches. La différenciation est le processus permettant d'obtenir des cellules fonctionnellement différentes, alors que l'auto-renouveau est le processus de division générant des cellules filles identiques à la cellule mère. Les études menées durant les dix dernières années ont permis de mettre en évidence que les cellules souches subissant l'auto-renouveau se trouvent dans des niches à faible teneur en ROS alors que celles qui subissent la différenciation sont caractérisées par une accumulation de ROS. Il est de plus en plus évident que cette régulation implique les résidus cystéines de plusieurs familles de protéines participant aux processus de différenciation. Le Tableau 4 résume quelques exemples de familles de protéines étudiées pour leur implication dans les processus de différenciation, ainsi que les cystéines réactives et les modifications sur ces résidus [86].

Tableau 4 - Régulateurs clés pouvant s'oxyder en réponse au stress oxydatif durant la différenciation des cellules souches [86]

<i>Régulateurs</i>	<i>Cystéines impliquées</i>	<i>Modifications</i>	<i>Activation de la fonction de la protéine</i>
FoxO4	Cys477	Pont disulfure	Passer de l'arrêt du cycle cellulaire à l'apoptose
	Cys239	Pont disulfure	Activation
Nrf2	Cys183	Non caractérisée	Activation
	Cys119, Cys235, Cys506	Non caractérisée	Inactivation
Keap1	Cys151, Cys273, Cys288	Pont disulfure	Inactivation
p53	Cys275, Cys277	Pont disulfure	Inactivation
	Cys124, Cys141, Cys182	S-glutathionylation	Inactivation
HIF-1 α	Cys533	S-nitrosylation	Activation
STAT3	Cys418, Cys426, Cys468	S-glutathionylation	Inactivation
NF- κ B (sous unité p50)	Cys62	S-glutathionylation	Inactivation
IKK β	Cys179	S-glutathionylation	Inactivation
Oct4	Inconnue	Pont disulfure	Inactivation
Ref-1	Cys65, Cys93	Pont disulfure	Inactivation
JNK1	Cys116	S-nitrosylation	Inactivation
P38	Cys39, Cys119, Cys162, Cys211	Non caractérisée	Inactivation
ATM	Cys2991	Pont disulfure	Activation

I.4.4 Discussion

En essayant de retracer l'enchaînement chronologique des événements marquants du développement de la biologie redox, nous tombons sur certains moments clés tels que la détection des premiers radicaux libres dans des systèmes biologiques, la découverte de la première enzyme qui permet d'éliminer un de ces radicaux : la superoxyde dismutase et la formulation et définition du terme « stress oxydatif ». La présence de dérivés réactifs pouvant engendrer une multitude de dégradations sur les grandes familles de biomolécules, et par suite dans les cellules et dans l'organisme entier était vue comme une aberration. La présence

de systèmes d'élimination de ces dérivés réactifs venait consolider ce paradigme. Ces constatations étaient accompagnées de la découverte de sources de production de ROS dans les cellules mêmes, soulevant ainsi la question de l'intérêt biologique de ces espèces et alimentant la recherche dans ce domaine. Depuis, des espèces réactives telles que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le monoxyde d'azote NO^* ont été étudiées pour leurs rôles dans la transduction de signal et sont considérées comme molécules messagères à part entière tout comme l'ATP et le Ca^{2+} . La participation des ROS à d'autres processus biologiques tels que la réponse immunitaire a été également largement étudiée. Ainsi, la notion de stress oxydatif s'est déplacée d'une simple présence de ROS à une perte de l'équilibre entre espèces oxydantes et antioxydantes en faveur des premières. Il convient ainsi de parler également de « stress réducteur » puisque une rupture de l'équilibre dans un sens comme dans l'autre peut avoir des effets délétères. Les efforts menés pour caractériser les systèmes permettant de conserver cette homéostasie ont permis de mieux comprendre le déroulement de certains processus biologiques et d'élucider les causes, le développement et les conséquences de certaines pathologies. Ceci a permis de proposer des solutions en médecine. Cependant, dans cette vision d'équilibre réside une notion de mal, représentée par un excès de ROS, et une notion de bien, représentée par les antioxydants. Cette vision très simpliste d'une réalité plus compliquée peut être ressentie dans la vie de tous les jours où la mode des « substances antioxydantes » se montre prévalente. Nous avons tous déjà lu un article nous conseillant d'intégrer les fruits rouges dans notre régime alimentaire quotidien pour éliminer les radicaux libres afin de garder une apparence jeune. On pourrait penser que cette mode se restreint au grand public et émane d'une connaissance non approfondie et/ou d'une volonté mercantile. Mais en réalité ce phénomène reflète des opinions présentes également dans le monde de la recherche. Effectivement, des molécules telles que la vitamine E ont été longuement investiguées pour leur rôle antioxydant. Dans ce cadre, l'utilisation thérapeutique d'antioxydants a été envisagée, mais les études ont souvent abouti à des résultats non concluants ou contradictoires. Ces conclusions poussent les chercheurs à se poser les questions quant à l'échec de ses études [87]. Quelles sont les raisons de ces résultats contradictoires ? Cet échec signifie-t-il que les ROS ne sont pas aussi importants qu'on le croyait ?

Par-delà les ROS et les antioxydants.

Il est essentiel de comprendre que le stress oxydatif est un terme très général décrivant des phénomènes impliqués dans plusieurs processus biologiques et cas pathologiques. Une première difficulté dans le traitement des problématiques redox découle des espèces oxydantes elles-mêmes. En effet, les ROS constituent une famille de molécules neutres et radicalaires avec des propriétés physiques et des affinités chimiques différentes. A ces dérivés il faut ajouter les RNS, les RCS, etc. Toutes ces familles ont la capacité d'interagir entre elles, et de générer d'autres espèces réactives comme illustré dans la Figure 12 [88].

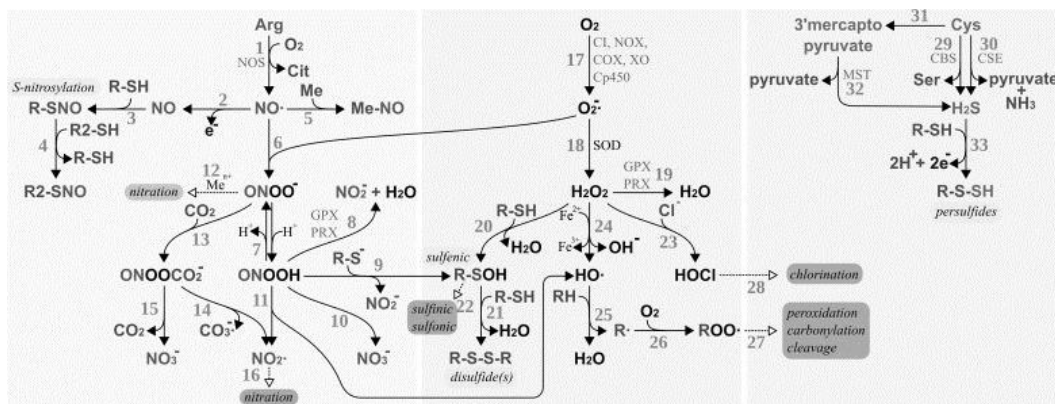


Figure 12 - Génération des différents dérivés réactifs : ROS, RNS et RSS avec leurs interactions [88]

Or nous constaterons que ces familles sont souvent traitées d'une manière globale ou totalement isolée ; des conférences et congrès séparés sont même organisés sur les thématiques ROS et RNS. Un deuxième niveau de complexité s'ajoute quand nous considérons toutes les sources exogènes et endogènes qui peuvent générer chacune des espèces étudiées. Les mêmes dérivés réactifs ont également des cibles différentes avec des modifications et donc des effets différents. Les dégâts résultant de l'action de certains dérivés réactifs sont parfois réversibles. D'autres, comme la carbonylation des chaînes latérales des acides aminés des protéines, ne sont pas réparables. Dans ce cas, les protéines sont souvent dégradées par les protéasomes ou les phagosomes. Certaines biomolécules peuvent parfois être tellement oxydées qu'elles ne sont ni réparables ni dégradables. Les cellules agissent en séquestrant ces biomolécules par des chaperons. Les processus de réparation et les enzymes impliquées sont donc spécifiques aussi au cas étudié.

En tant que molécules messagères, les espèces réactives transmettent rarement le signal d'une manière linéaire, la transduction de signal s'effectue souvent en activant plusieurs voies de signalisation en même temps. Ces voies de signalisation se croisent et sont régulées d'une

manière positive et négative. Ceci est illustré par les effets opposés que peuvent avoir les ROS : ils peuvent aussi bien promouvoir que freiner l'apoptose, l'inflammation, etc. L'expression « Etude des effets du stress oxydatif sur une lignée cellulaire donnée » devient donc inexacte. « L'étude des effets du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 » ou « L'étude des effets de l'inhibition de l'expression de la superoxyde dismutase » sont des expressions qui illustrent mieux les cas étudiés. De plus, vu la présence étendue des sources et des cibles de ROS dans la cellule, la notion de localisation cellulaire et de diffusibilité des dérivés réactifs prend de l'importance. En effet, le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde d'azote sont caractérisés par une diffusibilité élevée à travers les membranes biologiques (expliquant leur rôle en tant que molécules messagères), à l'inverse des ions superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et peroxynitrite $ONOO^-$. Ainsi, les ions superoxydes produits dans la mitochondrie sont susceptibles de s'y accumuler et d'interagir avec les composantes de cet organelle [89]. D'une manière similaire, les sources de ROS sont souvent localisées au niveau des membranes ou des organites cellulaires proches de leurs cibles. Les mitochondries sont même capables de se déplacer et créer des environnements localisés riches en espèces réactives [90].

D'autre part, la même précision doit être apportée au niveau des cibles. Plus spécifiquement, en protéomique, les résidus cystéines affectés doivent être finement identifiés. Différentes modifications sur ces résidus peuvent avoir des implications différentes. La quantification de la fraction modifiée devient aussi une donnée importante quant à l'activation ou non d'une cascade de signalisation par exemple. En effet, l'exposition de lymphocytes T à des concentrations physiologiques ou même modérées de ROS n'est pas suffisante pour déclencher les cascades de signalisation étudiées [40]. C'est pourquoi, des tentatives de classification du stress ont été effectuées en fonction de son intensité. En prenant en compte l'activation de certaines voies de régulation ainsi que l'oxydation de certaines cibles des ROS, Lushchak V. propose une classification en quatre catégories [91], à savoir :

- Stress oxydatif basal
- Stress oxydatif de basse intensité
- Stress oxydatif d'intensité intermédiaire
- Stress oxydatif d'intensité élevée.

I.4.5 Les familles de protéines impliquées dans l'homéostasie redox

Face aux dangers potentiels des dérivés réactifs, les organismes vivants ont développé des mécanismes de défense adaptés. Ces systèmes permettent de maintenir l'équilibre

indispensable au bon fonctionnement de la signalisation redox et comptent souvent des familles de protéines conservées à travers les espèces. Parmi ces systèmes figurent OxyR (senseur de peroxyde H_2O_2) et SoxR (senseur de superoxyde $O_2^{\bullet-}$) chez *Escherichia coli*, Yap1 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Levure) et le système Nrf2-Keap1 chez l'Homme. Ces systèmes sont sensibles à toute dérégulation de l'homéostasie redox et promeuvent, le cas échéant, l'expression d'enzymes permettant de retrouver l'équilibre. Les principales enzymes sont décrites dans les paragraphes suivants.

I.4.5.1 Les thiorédoxines

Petites réductases, autour de 12 kDa de masse, les **thiorédoxines** (TRX) catalysent la réduction des ponts disulfure des protéines. Elles constituent une famille de protéines conservées, des bactéries à l'Homme avec un site actif constitué d'un motif cystéine-glycine-proline-cystéine. Les thiorédoxines partagent la même organisation structurale (trois hélices α autour de quatre feuillets β) avec d'autres protéines redox. Les thiorédoxines, étant les premières à avoir été découvertes, donnent le nom à cette superfamille qui comprend glutarédoxines, peroxyrédoxines, glutathion peroxydases et protéine disulfure isomérases [88].

Les TRX font partie d'une chaîne de réduction des ponts disulfure, présentée à la Figure 13. Elles agissent comme donneurs d'électrons à de nombreuses protéines, dont les peroxydases et les ribonucléotide réductases. Suite à cette réaction de réduction, le site actif des TRX contient un pont disulfure entre les cystéines catalytiques. Les TRX sont ensuite régénérées par les **thiorédoxine réductases** (TRR). Avec 55 kDa par monomère, ces protéines sont fonctionnelles sous forme d'homodimères présentant un site actif contenant deux cystéines (dont une sélénocystéine chez les eucaryotes supérieurs). Le site actif de la TRR est régénéré par réduction du pont disulfure par le NADPH [88].

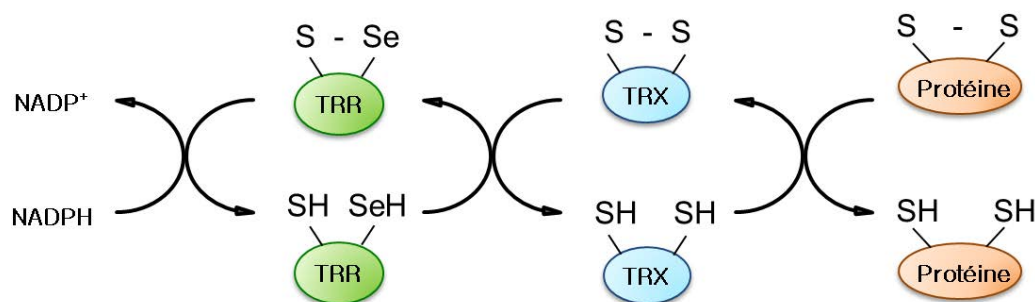


Figure 13 - Représentation schématique de la réduction du pont disulfure d'une protéine par le système TRX-TRR. Dans cette voie redox la thiorédoxine est régénérée par la thiorédoxine réductase alors que le NADPH représente le donneur final d'électrons.

I.4.5.2 Les glutarédoxines

Les **glutarédoxines** (GRX) ont été décrites chez des mutants d'*Escherichia coli* n'exprimant pas de thiorédoxine mais capables quand même de régénérer la ribonucléotide réductase indispensable à leur croissance [92]. Les glutarédoxines sont divisées en deux groupes en fonction du nombre de cystéine dans leur site actif, les dithiols (avec un motif Cys-X-X-Cys) et les monothiols (avec un motif Cys-X-X-Ser). Elles possèdent des fonctions analogues aux thiorédoxines et catalysent la réduction des ponts disulfure des protéines mais également les ponts disulfure protéine-glutathion. Elles ne sont cependant pas régénérées par la TRR mais par le glutathion, d'une manière non enzymatique. Le glutathion qui se trouve ainsi oxydé sous forme de GSSG est régénéré par la **glutathion réductase** (GLR), le NADPH étant toujours le donneur final d'électrons.

I.4.5.3 Les peroxyrédoxines

Comme leur nom l'indique, les **peroxyrédoxines** (PRX) ont une fonction peroxydase. Ces protéines de 20 à 30 kDa de masse sont abondantes dans les cellules et la majorité fonctionne en tant qu'homodimères. Chez les mammifères, elles sont divisées en trois groupes, les PRX typiques à deux cystéines (pont disulfure intermoléculaire), les PRX atypiques à deux cystéines (pont disulfure intramoléculaire) et les PRX à une cystéine [93]. Certaines PRX sont spécialisées dans l'élimination des peroxydes organiques comme l'exemple de la peroxyrédoxine Ahp1 chez *Saccharomyces cerevisiae* [94]. Les PRX sont régénérées par le système TRX-TRR. De plus, les PRX constituent le substrat de la seule enzyme connue pour réduire les acides sulfiniques. Effectivement, les PRX à deux cystéines sont susceptibles à la suroxydation, la **sulfirédoxine** permet leur régénération [95]. Outre leur fonction redox, les PRX possèdent également une fonction chaperon.

I.4.5.4 Les glutathions peroxydases

Les **glutathion peroxydases** (GPX) catalysent la réaction de réduction du H_2O_2 et des peroxydes organiques en eau. Certaines GPX fonctionnent avec des sélénocystéines dans leur site catalytique. Elles sont régénérées par le système GRX-GSH-GLR, mais certaines sont réduites par le système TRX-TRR [96].

I.4.5.5 Les superoxyde dismutases

Découverte en 1969 par *Fridovich et al.*, la famille des **superoxyde dismutases** (SOD) catalysent la réaction d'élimination de l'ion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ par dismutation pour donner le peroxyde d'hydrogène et de l'eau. Ces enzymes agissent par l'action des métaux qu'elles contiennent et qui les caractérisent. Chez les mammifères trois types de SOD sont connues, la SOD Cu-Zn, la SOD Fe et la SOD Mn (mitochondriale) [97].

I.4.5.6 Les catalases

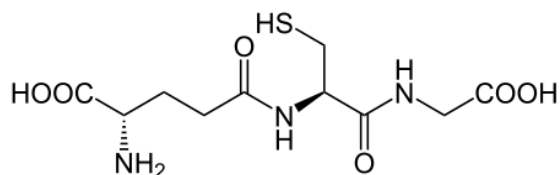
Nommées ainsi pour leur action catalytique sur le peroxyde d'hydrogène, les **catalases** sont présentes chez la grande majorité des espèces à respiration aérobie. Les membres de cette famille de protéines contiennent souvent un groupement hème permettant de catalyser la réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène en O_2 et H_2O [98].

I.4.5.7 Les méthionine sulfoxyde réductases

Outre la cystéine, les résidus méthionines sont hautement susceptibles aux phénomènes d'oxydation. Les **méthionine sulfoxyde réductases** permettent la réparation des résidus affectés. Ces protéines, très conservées chez les organismes vivants, possèdent une ou plusieurs cystéines catalytiques dans leur site actif. Ces réductases peuvent être régénérées par la TRX ou le glutathion [99].

I.4.6 Les petites molécules impliquées dans l'homéostasie redox (exemple du glutathion)

Un nombre de petites molécules sont impliquées dans la régulation redox. Une des plus importantes de ces molécules est le glutathion (Figure 14).

Figure 14 - Formule semi-développée du glutathion ou γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine

Le glutathion est le principal porteur de groupement thiol non protéique impliqué dans la défense antioxydante cellulaire. C'est un tripeptide comportant un acide glutamique, une cystéine et une glycine. L'oxydation du glutathion mène à la formation du disulfure de glutathion GSSG (deux molécules de glutathion liées par un pont disulfure). Le couple GSH-GSSG est considéré comme un tampon redox cellulaire et joue un rôle clé dans le système GRX-GSH-GLR. L'importance de la notion de distribution du glutathion et de sa forme oxydée est soulignée par les valeurs du rapport de concentrations $[GSH] / [GSSG]$ qui change selon le compartiment cellulaire. Effectivement ce rapport est estimé autour de 1 à 3 dans le réticulum endoplasmique où règne un environnement oxydant alors qu'il est 100 à 1000 fois plus important dans le cytosol. Des concentrations élevées en GSH dans le réticulum endoplasmique mènent à la réponse UPR (*Unfolded protein response*) et au dépliement des protéines [100]. Le glutathion majoritairement libre dans la cellule se trouve également lié aux protéines, cette modification est impliquée dans diverses fonctions biologiques et sera développée dans le chapitre suivant (§II.2.1.1).

Un nombre d'autres petites molécules d'origine endogène ou exogène participe à l'élimination des radicaux libres et au maintien de l'équilibre redox. Parmi ces molécules figurent la vitamine E déjà citée, la vitamine C et l'acide urique (Figure 15) [101].

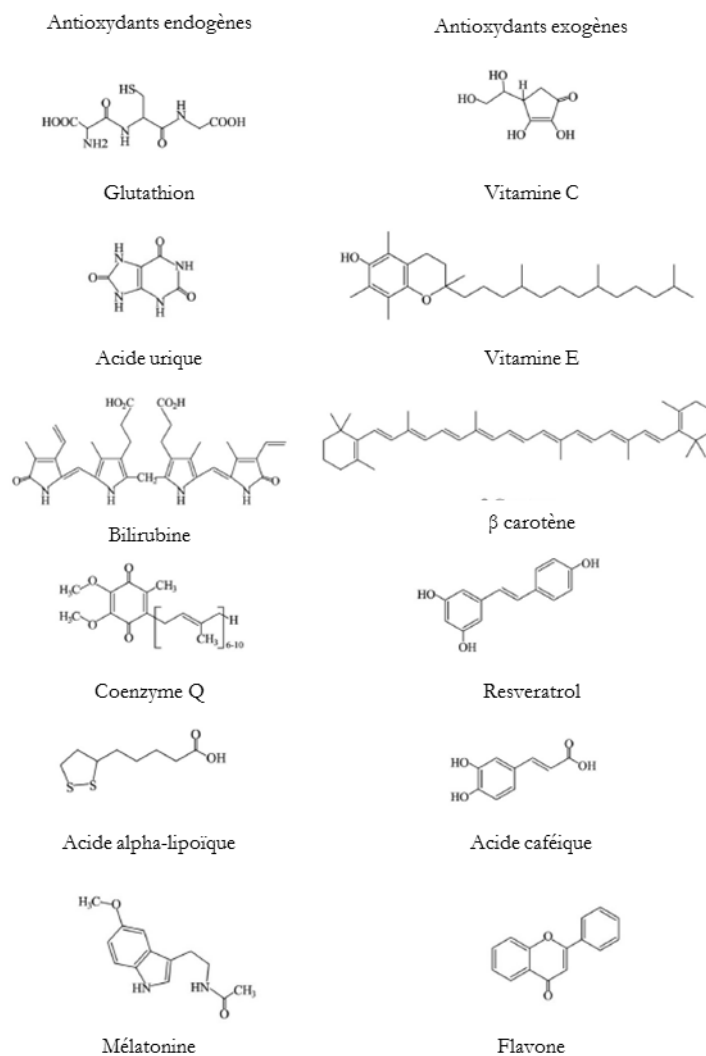


Figure 15 - Formules semi-développées de quelques petites molécules endogènes et exogènes ayant des propriétés antioxydantes.

Chapitre II : Les techniques mises en œuvre

La compréhension de toute problématique scientifique passe par l'étude de ses causes et ses effets. Il en est de même pour toutes les problématiques que nous pouvons classer sous 'Stress Oxydatif'. Caractériser, quantifier et classer les éléments impliqués dans ces phénomènes est au cœur du métier d'analyste en chimie et biochimie. Ceci concerne donc, les dérivés réactifs et leurs cibles ainsi que les voies de signalisation impliquées dans leurs régulations. Le développement d'outils adaptés devient essentiel pour proposer des solutions en diagnostic et en thérapie. Plus spécifiquement, les protéines représentent la plus importante famille de biomolécules qui non seulement subit les effets des dérivées réactifs, mais qui est également responsable de leurs régulations et de la réparation de leurs dégâts.

II.1 La Protéomique

Un protéome, entité dynamique et complexe, est défini comme l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe dans un environnement donné et à un moment donné [102]. La protéomique désigne la science qui étudie les protéomes, qu'il s'agisse d'études à grande échelle ou d'analyses ciblées très spécifiques. Dans ce domaine, la spectrométrie de masse (MS) se démarque grâce aux développements instrumentaux des dernières années. Ces développements, accompagnés d'une évolution des techniques séparatives en amont et des outils bio-informatiques en aval, ont fait de la MS la méthode phare des études protéomiques, aussi bien en criblage qu'en analyse ciblée. Les méthodes basées sur la détection des protéines par des anticorps, et dont le développement a précédé les développements en MS, restent couramment utilisées dans les études ciblées. Ces méthodes comprennent le transfert des protéines sur membrane (*Western Blot*) et le dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

II.1.1 Généralités

La MS se présente comme un outil puissant pour les études en protéomique, mais elle ne se limite pas à ce domaine. En effet, cette technique d'analyse permet d'accéder aux informations de masse, structure et quantité de toute molécule ionisable et trouve des applications dans des domaines larges et variés allant de la pétrochimie à l'astrophysique.

Dans les études appliquées à la biologie, la MS est employée couramment dans les sciences dites ‘-omiques’ : lipidomique, métabolomique, glycomique, etc.

L’étude des protéomes a toujours pour premier but l’identification des espèces présentes en mélanges complexes. Selon les études, l’aspect quantitatif relatif aux protéines identifiées peut s’ajouter aux informations recherchées. Deux approches en MS se distinguent en protéomique, à savoir l’approche ascendante ou *bottom-up* et l’approche descendante ou *top-down*.

II.1.2 L’approche ascendante ou *bottom-up*

De loin la plus couramment utilisée dans les études en protéomique, l’approche *bottom-up* se base sur l’identification des protéines à partir de fragments peptidiques générés par digestion, d’où son nom. Classiquement, une analyse de protéines en *bottom-up* se déroule ainsi : les protéines sont extraites de l’échantillon (culture cellulaire, tissu, etc.) et sont préparées pour la digestion en réduisant les ponts disulfure (par des agents réducteurs tels que le dithiothréitol (DTT), le tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) ou encore le β -mercaptoethanol, puis en bloquant les cystéines par un agent alkylant tel que l’iodoacétamine (IAM) ou le *N*-ethylmaléimide (NEM). L’étape suivante est le clivage protéolytique par digestion enzymatique. Selon les études, une enzyme spécifique est choisie en fonction de ses sites de coupure. En général, dans les études de criblage, la trypsine (site de coupure : côté C-terminal d’une arginine ou d’une lysine sauf quand ces résidus sont liés à une proline par leur côté C-terminal) est préconisée pour sa spécificité et la taille statistique attendue des peptides générés. En outre, les peptides tryptiques générés contiennent un résidu basique (arginine ou lysine) qui facilite leur ionisation en MS en mode positif.

Quand les protéines extraites sont séparées préalablement par électrophorèse en gel de polyacrylamide ou SDS-PAGE, la préparation de l’échantillon (réduction, alkylation et digestion) s’effectue *in-gel*. Dans tous les cas, l’étape suivante est une séparation du mélange peptidique par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), le plus souvent en recherche en configuration nano-LC, donc typiquement sur des colonnes de 75 μm de diamètre, permettant une sensibilité accrue. Une variété de phases existe pour effectuer la séparation, les phases octadécyle (C_{18} , chaînes alkyles à 18 atomes de carbone) étant les plus utilisées. Les peptides élués graduellement en fonction de leur hydrophobicité croissante par un gradient croissant de phase organique sont introduits dans un spectromètre de masse par une source qui permet leur ionisation (souvent source d’ionisation par

électronébulisation ESI ou désorption-ionisation laser assistée par matrice MALDI en protéomique).

L'analyse dans le spectromètre de masse comporte essentiellement deux étapes. La première consiste en une séparation des espèces ionisées en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) et la détermination de ce rapport (mode MS). La deuxième consiste en une sélection séquentielle de ces espèces, leur fragmentation et l'acquisition des rapports m/z des fragments ainsi générés (mode tandem ou MS/MS). Selon le type de fragmentation employé, souvent le mode CID (*Collision-induced dissociation*) ou le mode HCD (*Higher-energy collisional dissociation*) (pour le principe, voir Annexe I page 217), des fragments spécifiques sont générés. La Figure 16 résume les types de fragments obtenus par les différents modes de fragmentation.

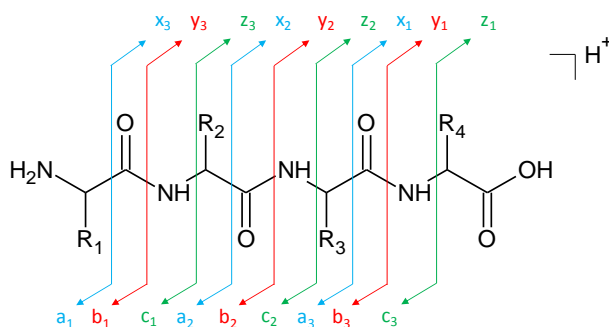


Figure 16 - La nomenclature des fragments adoptée aujourd'hui a été initiée par Roepstorff et Fohlman en 1984 [103] puis complétée par Biemann en 1990 [104]

L'étape suivante consiste en un traitement bio-informatique des données enregistrées. L'information de la masse du peptide associée à l'information de la masse des fragments générés permet le séquençage de la chaîne peptidique et donc l'identification du peptide. Ceci s'effectue par comparaison des masses expérimentales avec les masses théoriques des peptides suite à une digestion *in-silico* des protéines présentes dans les banques de données. Un score est attribué à l'identification en fonction de l'algorithme (Mascot, MaxQuant, etc.) utilisé pour effectuer la recherche dans les banques de données. L'identification des peptides permet de remonter aux protéines de l'échantillon. La Figure 17 résume les différentes étapes de cette approche aussi appelée approche *shotgun*.

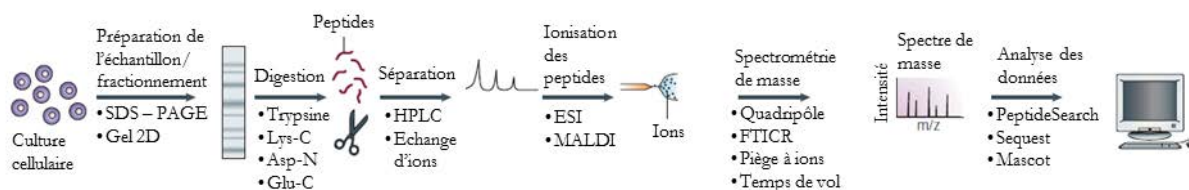


Figure 17 - Protéomique *Shotgun* : image résumant le déroulement classique d'une analyse protéomique [105].

II.1.3 L'approche descendante ou *top-down*

Dans cette approche, l'analyse en spectrométrie de masse est réalisée sur les protéines entières, la préparation de l'échantillon s'affranchit donc de la digestion enzymatique. La séparation des protéines, toujours en HPLC, s'effectue sur des phases stationnaires adaptées, moins hydrophobes, souvent de type C₄ dans ce cas (chaines alkyles à 4 atomes de carbone). Les protéines éluées graduellement sont introduites dans le spectromètre de masse et y sont fragmentées selon des règles de fragmentation assez proches de celles présentées pour les peptides. Etant donné que les espèces analysées dans ce cas possèdent des masses moléculaires plus importantes, des modes de fragmentation spécifiques sont préconisés, à savoir l'ECD (*Electron-capture dissociation*), l'ETD (*Electron-transfer dissociation*) ou encore l'IRMPD (*Infrared multiphoton dissociation*). Les masses moléculaires plus élevées des protéines et de leurs produits de fragmentation nécessitent des spectromètres de masses comprenant des analyseurs à haute résolution afin de déterminer avec une bonne exactitude les rapports masse/charge sur une grande gamme de masse. Souvent ces études sont effectuées avec des spectromètres de masse avec des analyseurs à transformée de Fourier, de type FTICR (*Fourier transform ion cyclotron resonance*) et Orbitrap (trappe orbitale).

Une stratégie dite *middle-down* existe également et consiste en une préparation de l'échantillon qui comprend une digestion enzymatique, le choix de cette enzyme (Glu-C, etc.) étant fait pour générer des peptides de taille supérieure (3 à 10 kDa) à ceux obtenus classiquement par digestion tryptique. L'étude des histones, protéines liées à l'ADN et possédant des séquences d'acides aminés comprenant des répétitions nombreuses d'arginine et de lysine, est un exemple d'étude employant l'approche *middle-down*.

II.1.4 Comparaison des deux approches *bottom-up* et *top-down*

Les deux approches présentées ont contribué chacune au développement de la protéomique. Chacune possède des atouts ainsi que des points faibles, mais elles sont avant tout complémentaires.

Effectuer l'étude sur les peptides offre un côté pratique, une robustesse et une possibilité d'analyse à haut débit inatteignable par l'approche *top-down*. Cette dernière présente cependant un avantage dans l'analyse des modifications post-traductionnelles. Effectivement, les protéines exprimées peuvent exister sous une variété de protéoformes présentant un grand nombre de modifications post-traductionnelles. Ces modifications peuvent coexister, favoriser d'autres modifications ou être mutuellement exclusives. Cette information est perdue quand l'analyse est effectuée sur les peptides puisque l'information des protéoformes qui produisent ces peptides n'est pas conservée comme le montre la Figure 18.

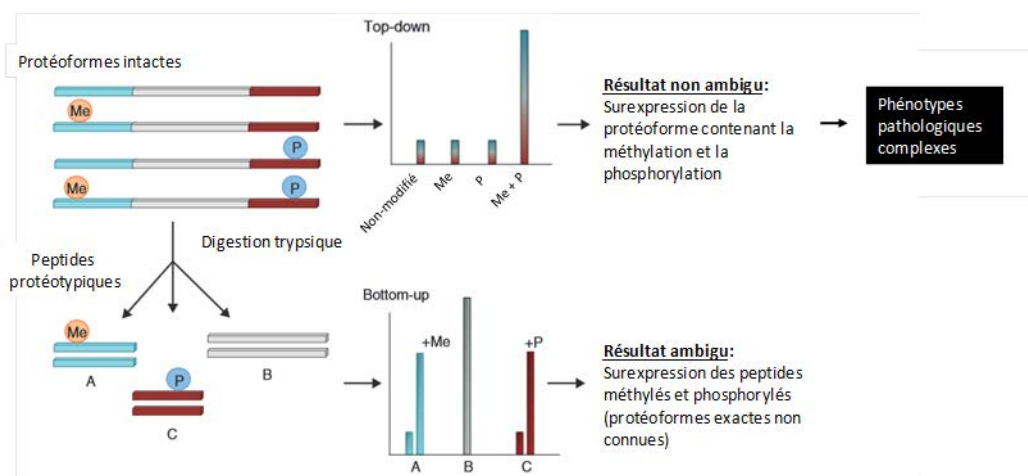


Figure 18 - L'approche *top-down* fournit des informations sur les phénotypes. Un gène peut donner plusieurs protéines modifiées par une (des) méthylation(s) (Me) et/ou une(des) phosphorylation(s) (P) par exemple. Ces formes, qui peuvent être simultanément exprimées dans le protéome, sont appelées protéoformes. L'approche *bottom-up* dans cet exemple permet d'observer une surexpression de peptides méthylés et phosphorylés sans identifier la forme protéique en jeu. L'approche *top-down* quant à elle, permet d'affirmer que c'est la forme méthylée et phosphorylée qui est surexprimée dans ce complexe (figure adaptée de Savaryn *et al* [106]).

Bien que très élégante, l'approche *top-down* reste cependant dominée par l'approche *bottom-up*. Même si la nécessité de spectromètres de masse à très grande gamme de masse est palliée par les sources d'ionisation ESI produisant des états de charge supérieurs, la haute résolution de mesure demeure un atout important, et le rapport signal/bruit résultant chute car chaque espèce moléculaire est distribuée dans de nombreux états de charge et dans chaque distribution isotopique. L'étape séparative en amont reste à ce jour délicate et n'offre pas la résolution obtenue avec la séparation des peptides. Mais le vrai goulot d'étranglement reste l'analyse bio-informatique en aval, car peu de logiciels de retraitement et de validation des données *top-down* existent en comparaison avec le large choix d'algorithmes disponibles

pour le retraitement des données *bottom-up*. L'approche *shotgun* – littéralement fusil de chasse – sera retenue dans ce projet.

II.2 Les modifications post-traductionnelles

Les études génétiques menées sur une variété d'organismes reflètent la diversité et la complexité des modifications post-traductionnelles. On compte 6 000 gènes pour *Saccharomyces cerevisiae* et environ 20 000 pour l'Homme. Cependant ces chiffres ne reflètent pas la complexité structurale des protéomes codés par ces gènes, qui est d'un autre ordre de grandeur (plus de 100 000 protéoformes pour l'Homme). Effectivement les processus d'épissages alternatifs permettent d'obtenir plusieurs protéines à partir d'un même gène. Les modifications post-traductionnelles (PTMs) ajoutent un autre niveau de complexité. En effet, les protéines peuvent être clivées et modifiées au niveau de plusieurs résidus aminés durant leur processus de maturation. Les PTMs jouent un rôle important dans l'acquisition d'une conformation dans l'espace, d'une fonction, stabilité, etc. Il est estimé que 5% du génome des eucaryotes code pour des enzymes dont la fonction est l'introduction de PTMs dans le protéome [107]. Quand il s'agit de modifications sur la chaîne latérale des résidus d'une protéine, la majorité des acides aminés est concernée (15 des 20 acides aminés standards). Plus de 150 types de modifications différentes sont connues sur les chaînes latérales des acides aminés sauf celles de l'alanine, la glycine, l'isoleucine, la leucine et la valine [108]. La phosphorylation (impliquée dans la signalisation), la glycosylation (impliquée dans les mécanismes de reconnaissances) et l'ubiquitination (impliquée dans la dégradation des protéines) ne sont que quelques-unes des modifications post-traductionnelles les plus connues. Le Tableau 5 présente les 15 acides aminés standards connus pour subir des PTMs au niveau de leur chaîne latérale, ainsi que quelques-unes de ces modifications [107], alors que la partie suivante détaillera les PTMs associées à la chaîne latérale des résidus cystéines.

Tableau 5 - Exemples de PTMs sur les chaînes latérales de certains acides aminés. Pas de PTM connue sur les chaînes latérale des résidus leucine, valine, alanine, isoleucine et glycine [107]. Une liste plus exhaustive peut être trouvée dans le livre *Posttranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory* [109].

Résidu	Réactions	Exemples
Acide aspartique	Phosphorylation, isomérisation	Protéine tyrosine phosphatases
Acide glutamique	Méthylation, carboxylation, polyglycination	Récepteurs de chimiotaxie, tubuline
Sérine	Phosphorylation, O-glycosylation.	Protéine sérine kinases et phosphatases, O-glycosylation de notch.
Thréonine	Phosphorylation, O-glycosylation.	Protéine thréonine kinases et phosphatases.
Tyrosine	Phosphorylation, Sulfonation, ortho-nitration.	Tyrosine kinases et phosphatases, maturation des récepteurs CCR5, réponse inflammatoire.
Lysine	Méthylation, acylation, biotinylation.	Méthylation et acylation des histones.
Histidine	Phosphorylation	Histidine kinases
Cystéine	Hydroxylation, formation de ponts disulfure.	Intermédiaires sulféniques, protéines en environnement oxydant.
Méthionine	Oxydation	Méthionine sulfoxyde réductase
Arginine	Méthylation	Histones
Asparagine	N-glycosylation	N-glycoprotéines
Glutamine	Transglutamination	Réticulation des protéines
Tryptophane	C-mannosylation	Protéines de la membrane cytoplasmique
Proline	Hydroxylation	Collagène

II.2.1 La protéomique redox et les modifications sur la cystéine

Une grande proportion des protéines transite dans le réticulum endoplasmique en vue de leur sécrétion ou de leur expression à la membrane plasmique, et une large proportion d'entre elles nécessite la formation de ponts disulfure. Ce processus, connu sous le nom de repliement oxydatif, concerne les cystéines, il est essentiel pour la stabilité et la fonction des protéines. Les cystéines ne sont pas les seuls résidus connus à s'oxyder. L'oxydation de la méthionine conduit à la formation de la méthionine sulfoxyde ou de la méthionine sulfone. Les radicaux hydroxyles oxydent la phénylalanine en o-tyrosine et les radicaux tyrosyles forment des liaisons dityrosine inter et intramolécule [110]. L'hydroxylation concerne également les résidus tyrosine, acide aspartique et tryptophane [111]. Cependant les résidus

cystéines sont parmi les plus réactifs et les plus susceptibles de subir les réactions d'oxydation. Ainsi, le terme 'redoxome' (l'état redox du protéome, introduit en 2011 par Chiappetta et al. [112]) rencontré dans la littérature renvoie souvent à cet acide aminé et les modifications post-traductionnelles sur sa chaîne latérale.

L'atome de soufre des résidus cystéines offre une gamme étendue de réactivité chimique, comprenant des liaisons covalentes avec les éléments essentiels (C, H, O, N, P) et des liaisons de coordination avec les métaux (Cu, Fe, Zn), permettant ainsi d'introduire une grande variété structurale et fonctionnelle au niveau du protéome. Il est intéressant de souligner qu'un nombre important de résidus cystéines est conservé à travers toutes les formes de vie. L'atome de soufre possède 6 électrons de valence et une orbitale 3d libre donnant accès à des états d'oxydation allant de -2 à +6 et donc des propriétés de don et de gain d'électrons plus variées que l'oxygène et l'azote. Il faut noter que la réactivité du groupement thiol d'une cystéine est directement liée à son état de protonation, qui est directement lié au pKa du thiol en question. Or, au sein d'une protéine, la présence de groupements chargés, aromatiques ou donneurs/accepteurs d'hydrogène peut avoir un effet majeur sur la valeur du pKa du thiol d'une cystéine [113]. Cette valeur peut varier entre 4 et 10 [112]. Le thiol d'une cystéine sera essentiellement protoné à des pH inférieurs au pKa, déprotoné à des pH supérieurs au pKa et en équilibre entre les deux formes à des valeurs de pH autour du pKa. En général, la forme thiolate (S^-) est un meilleur nucléophile que la forme thiol (-SH) et présente une réactivité plus élevée envers les oxydants électrophiles. Il s'ensuit que, selon leur pKa, toutes les cystéines ne possèdent pas la même réactivité et qu'elles jouent des rôles fonctionnels différents. Parmi ces rôles fonctionnels, quatre grandes catégories peuvent être proposées, à savoir : structurale, fixation de métal, catalytique et régulatrice [114].

Les résidus cystéines peuvent subir une variété de modifications post-traductionnelles menant à la formation de ponts disulfure (S-S), acides sulféniques (S-OH) et groupements s-nitrosos (S-NO), entre autres. Ces modifications interviennent dans la régulation des protéines, dans le maintien de leur structure et dans la réponse au stress oxydatif, aussi bien dans la signalisation que dans la protection.

En plus de la cystéine, le génome contient des instructions de codage des sélénocystéines. Ce résidu, connu comme le 21ème acide aminé, est identique à la cystéine avec l'exception du remplacement de l'atome de soufre par un atome de sélénium. La cystéine et la sélénocystéine subissent des modifications comparables, mais le sélénium est

plus acide. Il convient donc d'inclure la sélénocystéine dans la partie suivante détaillant les principales modifications redox ayant lieu sur les cystéines.

II.2.1.1 Les ponts disulfure

Les ponts disulfure, une des modifications les plus connues sur les cystéines, jouent un rôle central dans le repliement des protéines et donc dans leur stabilité. La formation des ponts disulfure s'effectue essentiellement dans le réticulum endoplasmique. Dans cet organe, des protéines disulfure isomérases introduisent cette modification au niveau des différentes cystéines des protéines nouvellement synthétisées jusqu'à l'obtention de la bonne configuration (Figure 19) [115]. Ce processus est moins fréquent dans les autres compartiments cellulaires où un environnement réducteur est maintenu par un nombre d'enzymes dites réductases.

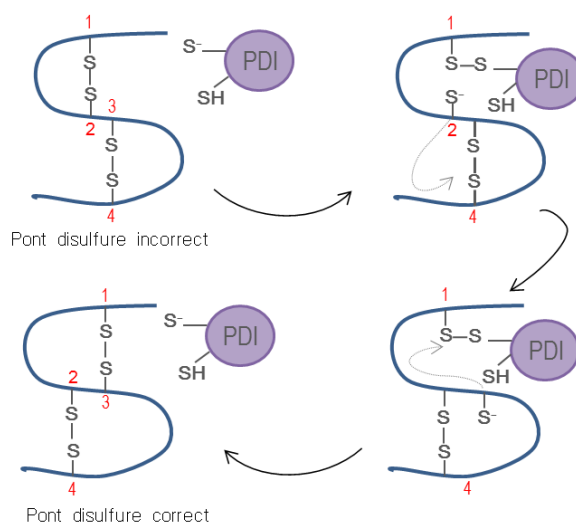


Figure 19 - Représentation schématique de l'action d'une protéine disulfure isomérase (PDI) sur une protéine. Dans cette image la PDI corrige deux ponts disulfure incorrects (formés entre les cystéines 1 et 2 d'un côté et les cystéines 3 et 4 d'un autre côté) afin d'obtenir la bonne configuration fonctionnelle (ponts disulfure entre les cystéines 1 et 3 d'un côté et les cystéines 2 et 4 d'un autre côté)

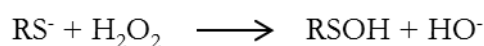
La formation des ponts disulfure est impliquée dans diverses fonctions des protéines, y compris le maintien de l'homéostasie redox, l'activité chaperon, le métabolisme, et la régulation de la transcription et de l'expression protéique [116]. La formation des ponts disulfure agit également sur la localisation cellulaire des protéines ainsi que sur leurs interactions avec d'autres protéines, tel que l'exemple du système Nrf2-Keap1 [70] évoqué dans la partie §I.4.2.1.

La **S-glutathionylation** est une modification particulière de la cystéine résultant de la formation d'un pont disulfure mixte entre une cystéine d'une protéine et le résidu cystéine

d'une molécule de glutathion. Différents mécanismes sont proposés pour expliquer la formation de cette modification et comprennent entre autres l'interaction entre un thiol libre d'une protéine et une molécule de disulfure de glutathion (GSSG) ou d'autres formes de glutathion oxydé telles que la forme nitrosylée (GSNO) et la forme sulfénique (GSOH) [117]. Cette modification a aussi bien lieu dans des conditions de stress oxydatif, que dans des conditions physiologiques. Elle est réversible et impliquée dans la régulation de l'expression des protéines, la signalisation et le repliement oxydatif dans le réticulum endoplasmique [118].

II.2.1.2 L'acide sulfénique

Les acides sulféniques (RSOH) sont les oxoacides organosoufrés les plus simples par comparaison aux acides sulfiniques (RSO₂H) et sulfoniques (RSO₃H). Les RSOH sont généralement très instables et très réactifs. Les mêmes conditions qui affectent la valeur du pKa du thiol d'une cystéine affectent la stabilité de l'acide sulfénique correspondant. Les RSOH sont générés par oxydation des thiols des cystéines par des oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène selon l'équation suivante :



Les groupements acides sulféniques peuvent réagir avec les groupements thiols de la même protéine, d'une autre protéine ou de petites molécules pour former respectivement des ponts disulfure intramoléculaires, intermoléculaires et mixtes. Ceci constitue non seulement le mécanisme principal de la formation des ponts disulfure, mais également un moyen de protection contre la suroxydation des acides sulféniques (modification réversible) en acides sulfiniques et sulfoniques (modifications irréversibles) [119]. La formation des ponts disulfure est également une des voies principales de la signalisation redox impliquée dans la régulation de plusieurs enzymes et facteurs de transcription tels que certaines tyrosine kinases, le coactivateur de transcription Yap1 et les peroxyrédoxines. Les acides sulféniques sont également impliqués dans la coordination des métaux de certaines métalloprotéines telles que la nitrile hydratase [116].

II.2.1.3 La S-nitrosylation

La S-nitrosylation est la modification du thiol d'un résidu cystéine par ajout d'un groupement fonctionnel nitroso –NO. Cette réaction s'appelle nitrosation mais le terme nitrosylation est largement utilisé pour désigner cette modification par conformité avec la

nomenclature des PTMs qui utilise souvent le suffixe ‘-ylation’. Plusieurs mécanismes sont proposés pour le déroulement de cette modification, tel le transfert d’un groupe nitroso d’une molécule de glutathion nitrosylé (GSNO) à une cystéine libre d’une protéine [120]. Dans ce cas, ce mécanisme serait régulé par la GSNO réductase, l’enzyme qui contrôle les niveaux de GSNO. La source principale du groupe nitroso reste le monoxyde d’azote NO[•] produit par les oxyde nitrique synthases [114]. Cette modification est réversible. Sa réduction est catalysée par le système TRX-TRR déjà présenté (voir Figure 13).

La S-nitrosylation des protéines est l’une des PTMs redox les plus étudiées car elle permet la transduction d’un signal NO-dépendant, soulignant le rôle de cette molécule en tant que second messenger et la spécificité du message transmis. Le rôle de la S-nitrosylation a été établi dans la régulation de plusieurs protéines et complexes protéiques tels que les caspases, les récepteurs membranaires, les canaux ioniques et certains facteurs de transcription [120]. Ces rôles sont étudiés aussi bien dans des conditions physiologiques que des conditions pathologiques comme les maladies neurodégénératives [121] et les maladies cardiovasculaires [122].

II.2.1.4 Les acides sulfiniques et sulfoniques

Les acides sulféniques (degré d’oxydation de l’atome de soufre : 0), peu stables en général, sont vus comme des intermédiaires réagissant avec des thiols adjacents [123], ou d’autres molécules en route vers d’autres modifications [124]. Dans certains cas, comme la présence d’un excès d’oxydant [116], ces oxoacides peu stables peuvent subir des réactions de suroxydation menant à la formation d’acides sulfiniques RSO₂H (degré d’oxydation de l’atome de soufre : +2) et sulfoniques RSO₃H (degré d’oxydation de l’atome de soufre : +4).

Les acides sulfiniques sont moins réactifs que les acides sulféniques, leur pKa autour de 2 implique qu’ils sont déprotonés dans les conditions physiologiques. Cette modification généralement irréversible constitue un exemple des dégâts engendrés par les dérivés réactifs. Récemment, la sulfirédoxine a été décrite comme l’enzyme capable de réduire les cystéines des peroxyrédoxines oxydées en acide sulfinique [123]. Ces découvertes ont soulevé des questions quant à l’intérêt biologique que peut avoir la suroxydation des cystéines en acide sulfinique. La sulfirédoxine n’agit que sur une partie des peroxyrédoxines, dites typiques à deux cystéines. Un rôle dans la régulation de l’activité chaperon de ces protéines est proposé pour la sulfirédoxine [95]. D’autres rôles sont proposés pour la suroxydation des cystéines des peroxyrédoxines en acide sulfinique, tels que la régulation de la réponse antioxydante (chez *Schizosaccharomyces pombe* [125]).

Bien que la modification des cystéines en acide sulfinique soit stable, ces résidus peuvent subir des réactions d'oxydation par certains dérivés réactifs (H_2O_2 , HOCl , ONOOH) menant à la formation d'acide sulfonique, le plus haut niveau d'oxydation des thiols. Cette modification est considérée comme une impasse biologique puisqu'aucun mécanisme de réduction n'a été mis en évidence jusqu'à présent [113]. Cette modification est surtout étudiée pour son implication dans des cas pathologiques, comme la suroxydation en acide sulfonique des cystéines de la superoxyde dismutase dans le cadre de la sclérose latérale amyotrophique [126].

II.2.1.5 Autres modifications des résidus cystéines

En plus des modifications citées ci-dessus, d'autres PTMs ont été décrites sur la cystéine. Parmi ces modifications figurent la méthylation [127], l'acétylation [128], l'acylation (notamment la palmitoylation, modification réversible impliquée dans les processus de signalisation [129]) et la sulfhydratation (ou persulfuration par l'action du disulfure d'hydrogène H_2S , soulignant le rôle de cette espèce en tant que molécule messagère [130]). Au total, au moins 18 modifications non radicalaires des résidus cystéines présentes biologiquement ont été décrites, les principales sont présentées en Figure 20. Une liste plus exhaustive peut être trouvée dans la revue de Paulsen et Carroll [116]. Ces modifications ont des degrés de stabilité et des impacts biologiques différents [131]. Une sélectivité des cystéines envers ces modifications et donc envers les différents dérivés réactifs font de ces résidus des systèmes de détection discriminants et spécifiques.

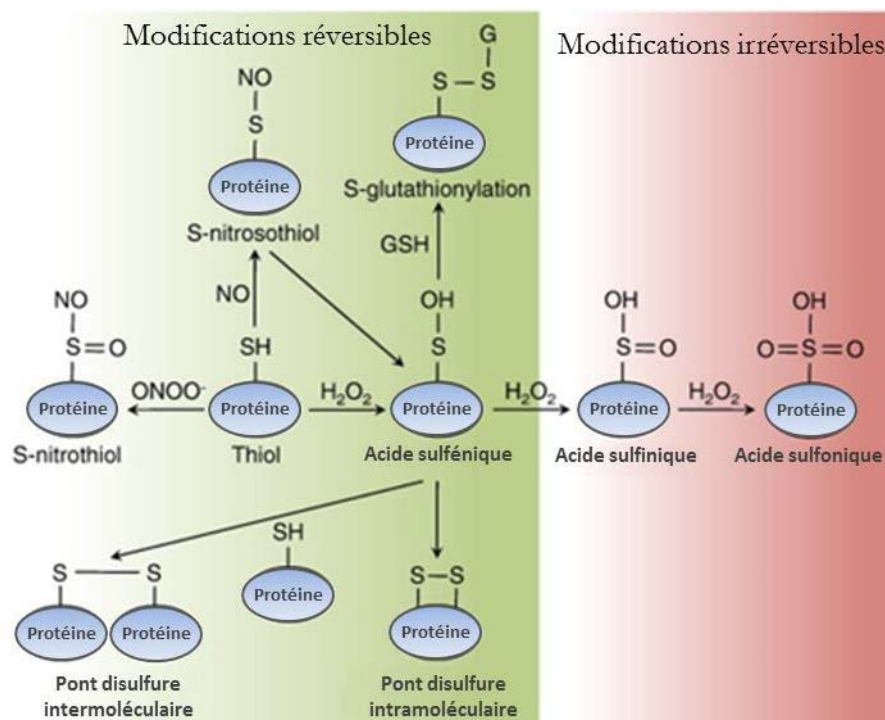


Figure 20 - Les principales modifications réversibles et irréversibles sur les cystéines [86].

II.3 La quantification par spectrométrie de masse

En général, la quantification en protéomique s'intéresse à la détection de faibles modulations de l'expression des protéines en réponse à une altération de l'exposome (ensemble des facteurs environnementaux non-génétiques que subit un organisme tout le long de sa vie et complétant l'effet du génome [132]). Et malgré les percées accomplies dans les dernières années et les développements instrumentaux, la quantification (notamment la quantification des PTMs) reste un des aspects les plus compliqués de la recherche en protéomique. Une première raison provient de la spectrométrie de masse elle-même, qui n'est pas intrinsèquement quantitative. En effet, l'efficacité de l'ionisation (réaction physico-chimique avec un rendement bien déterminé) et la réponse de détection dépend des caractéristiques physico-chimiques de l'analyte en question (taille, acidité/basicité, hydrophilie/hydrophobie, présence de cycles aromatiques, etc.) mais aussi de son environnement chimique [133]. Une autre limitation provient de la complexité des échantillons biologiques et de l'étendue des concentrations des biomolécules, qui peut atteindre 6 ordres de grandeur dans les cellules et tissus, voire 10 ordres de grandeur dans les fluides biologiques. Cette étendue dépasse la gamme dynamique accessible en spectrométrie de masse.

Afin de surmonter ces obstacles, les chercheurs en spectrométrie de masse et en protéomique ont développé des outils spécifiques à l'information recherchée. Ainsi pour pallier au manque de gamme dynamique et réduire la complexité des mélanges, sont proposées des méthodes de séparation sur gel électrophorétique (*in-gel*) et sans gel (*off-gel*), des méthodes de fractionnement en chromatographie liquide (chromatographie liquide à deux dimensions, etc.) et une variété de méthodes de déplétion et d'enrichissement (enrichissement de certaines PTMs, anticorps, bibliothèques d'hexapeptides, etc.).

En ce qui concerne le problème de la différence d'efficacité d'ionisation entre les espèces, une variété de stratégies ont été développées : quantification relative, avec ou sans marquage métabolique ou chimique, et quantification absolue. La partie suivante présente donc ces différentes stratégies analytiques, avant de discuter des avantages et des inconvénients de chacune d'entre elles.

II.3.1 Les méthodes de quantification en protéomique

II.3.1.1 Le marquage métabolique

Les méthodes de marquage pour la quantification en spectrométrie de masse se basent toutes sur une idée commune : l'introduction d'isotopes stables (non radioactifs) créant un écart de masse ou introduisant un marqueur (*tag*) facilement distingué au niveau MS ou au niveau MS/MS, sans modification de la structure chimique. Dans le cas du marquage métabolique, l'introduction de l'écart de masse se fait par ajout d'acides aminés contenant ces isotopes lourds, qui seront incorporés métaboliquement dans les protéomes étudiés. Le but final est d'avoir une comparaison entre deux (ou plus) échantillons marqués ou non (quantification relative). La méthode appelée SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture*) a été développée par Ong et al. [134]. Comme son nom l'indique, la méthode SILAC se base sur le marquage des protéines lors des cultures cellulaires par des acides aminés marqués. Concrètement, des cellules représentant deux conditions différentes sont mises en culture dans deux milieux différents : l'un contenant des acides aminés non marqués et l'autre contenant des acides aminés marqués par des isotopes lourds du carbone (^{13}C) et/ou de l'azote (^{15}N). Un nombre minimum de passages est nécessaire pour l'incorporation des acides aminés lourds (6 en général). En protéomique classique, les acides aminés lourds lysine et arginine sont privilégiés pour avoir l'information quantitative sur l'ensemble des peptides tryptiques générés [135].

L'avantage majeur que présente cette méthode est de minimiser tout biais provenant des phases d'extraction, de manipulation et de préparation des échantillons, puisque ceux-ci sont mélangés dès la fin de la culture cellulaire et subissent simultanément l'intégralité des étapes qui suivent. Les peptides de même séquence primaire provenant des deux cultures auront également le même comportement chromatographique et seront donc co-élus et ensuite ionisés dans les mêmes conditions. Le signal obtenu pour chaque couple lourd-léger d'espèces correspondra à un doublet avec un écart de masse bien défini (Figure 21). La quantification est effectuée en calculant le rapport des aires des signaux obtenus au niveau MS.

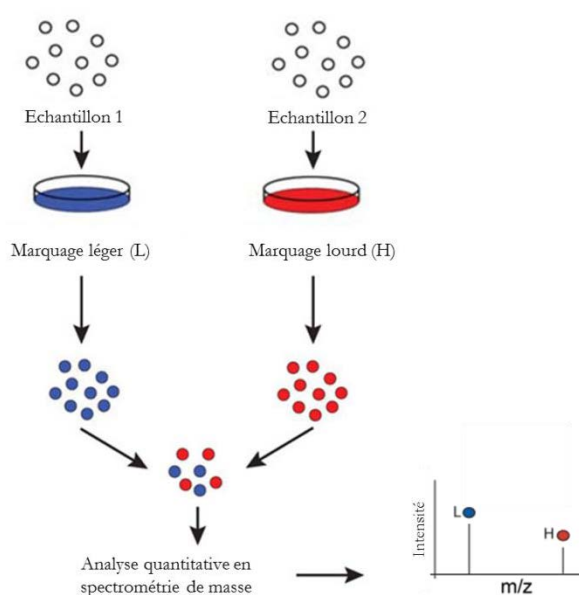


Figure 21 - Représentation schématique d'un marquage métabolique SILAC pour comparer deux cultures cellulaires représentant deux conditions différentes. Il est possible de comparer jusqu'à trois conditions différentes en utilisant des acides aminés légers, moyens et lourds. Image adaptée de Souza et al. [136].

II.3.1.2 Le marquage chimique

Des marqueurs isotopiques peuvent également être introduits dans l'échantillon après la synthèse des protéines par la cellule. Ceci implique que l'étape de marquage aura lieu plus tard par comparaison au marquage métabolique. Le marquage chimique emploie la réactivité du groupement amino terminal du peptide (N-ter) ou de la chaîne latérale de certains acides aminés pour incorporer des marqueurs permettant de différencier les peptides provenant des différents échantillons. Dans le cas du marquage enzymatique cependant, le marquage ne se fait ni sur le côté N-ter du peptide ni sur une des chaînes latérales de la séquence, mais en incorporant deux atomes d'oxygène 18 (^{18}O) (et donc une différence de 4 unités de masse)

au groupement carboxyle (C-ter) durant la digestion qui est effectuée dans l'eau lourde (H_2^{18}O) pour l'échantillon à marquer isotopiquement [137].

Une des premières méthodes de marquage chimique qui a été développée est la méthode ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tag*) proposée par Gygi et al. [138]. Dans cette méthode, les résidus cystéines sont modifiés par un réactif comportant un groupement iodoacétamide permettant le marquage, un bras espaceur et un groupement biotine permettant l'enrichissement des peptides marqués. Le bras espaceur peut contenir des isotopes lourds ou non (les isotopes lourds étant des deutériums initialement, remplacés par des ^{13}C dans la deuxième génération pour pallier aux différences d'interaction entre l'hydrogène et le deutérium avec la phase stationnaire en chromatographie liquide). Ainsi, les peptides co-élus donnent deux signaux en mode MS avec un écart de masse bien défini, le rapport de leur aire permet d'obtenir une information quantitative relative.

D'autres approches développées permettent d'effectuer la quantification au niveau MS/MS. Dans ce cas, le réactif marquant les peptides est composé d'une fonction réactive, d'un groupement permettant la normalisation de la masse (*mass normalizer*), et d'un groupement rapporteur. Le réactif, dans ses différentes versions destinées à marquer les échantillons à comparer, apporte la même différence en masse (un seul signal observé en MS). Cependant, cet écart de masse dû au marquage est différenciellement distribué entre le normalisateur et le rapporteur. Les espèces identiques provenant de différents échantillons sont co-isolées et fragmentées libérant des rapporteurs de masses différentes. La quantification se fait par estimation des rapports des aires en MS/MS des rapporteurs (Figure 22).

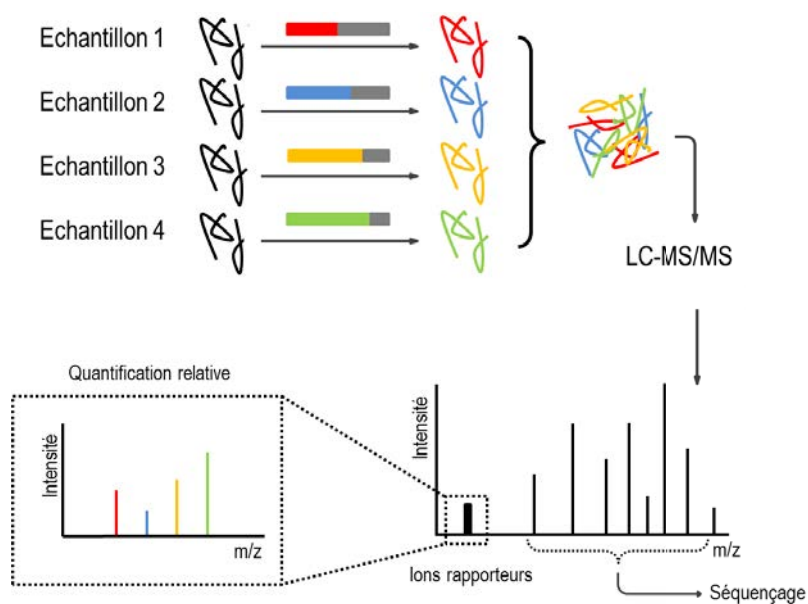
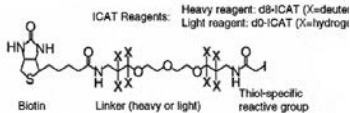

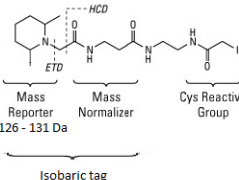
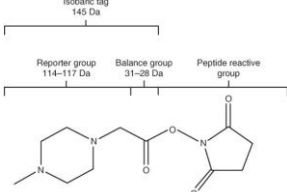
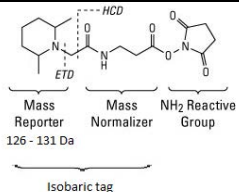


Figure 22 - Représentation schématique d'un marquage chimique avec quantification relative en MS/MS par ions rapporteurs. Les peptides ayant la même séquence sont marqués différemment dans chacune des conditions étudiées. Ces peptides génèrent un seul spectre MS. La fragmentation produit cependant des ions rapporteurs différents permettant une comparaison relative.

Les réactifs iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation*) [139] et TMT (*Tandem Mass Tags*) [140] utilisés tous les deux pour marquer les amines primaires se basent sur cette stratégie. Le Tableau 6 reprend quelques-unes des approches de marquage chimique utilisées en protéomique.

Tableau 6 - Différents types de marquage chimique et les sites concernés par ces marquages

<i>Nom</i>	<i>Site de marquage</i>	<i>Réactif</i>	<i>Niveau de quantification</i>	<i>référence</i>
^{18}O	Groupe carboxyle terminal	H_2^{18}O	MS	[137]
ICAT	Thiol	 <p>ICAT Reagents: Heavy reagent: d8-ICAT (X=deuter) Light reagent: d0-ICAT (X=hydrog)</p>	MS	[138]
cICAT (ICAT clivable)	Thiol		MS	[141]
IodoTMT	Thiol		MS/MS	[142]
iTRAQ	Amine primaire		MS/MS	[139]
TMT	Amine primaire		MS/MS	[140]

II.3.1.3 La quantification absolue

Les marquages métaboliques et chimiques tels qu'ils ont été décrits dans les paragraphes précédents permettent l'obtention d'une information quantitative relative entre deux échantillons représentant deux conditions différentes. Il convient dans certain cas d'établir les quantités absolues (et donc la concentration) d'une protéine ou d'un peptide dans un échantillon. Cette information peut servir également dans un but comparatif lorsqu'elle est établie dans plusieurs échantillons.

La détermination de la quantité absolue d'un analyte dans un échantillon s'effectue typiquement par l'ajout d'un standard interne dont la concentration a été établie antérieurement. Ce standard doit avoir des propriétés physico-chimiques les plus proches

possibles de l'analyte d'intérêt et doit être stable. Le marquage par des isotopes lourds stables se présente encore une fois comme la solution idéale.

Le standard interne peut être ajouté sous la forme de peptide. Cette stratégie utilisant les peptides AQUA (*Absolute QUAntification of proteins*) a été développée par Gerber et al. [143]. Afin de minimiser les biais pouvant affecter l'échantillon notamment durant l'étape de digestion, les peptides marqués par des isotopes stables peuvent être introduits à l'échantillon sous forme de protéine chimérique, comme par exemple l'approche QconCAT (*Quantification conCATamer*) [144]. Cette protéine contient certains peptides provenant d'une même protéine recombinante ou de plusieurs protéines différentes. Finalement, étant donné que l'introduction d'une protéine chimérique n'élimine pas tous les biais de la digestion car cette protéine ne se comporte pas comme la protéine recombinante, la protéine entière marquée peut être introduite en tant qu'étalon interne. Cette stratégie est connue sous le nom de PSAQ (*Protein Standard Absolute Quantification*) [145].

II.3.1.4 La quantification sans marquage

Le marquage par dilution isotopique est la référence standard pour la quantification. Cependant, elle nécessite une ou plusieurs étapes de préparation additionnelle et peut s'avérer coûteuse. C'est pourquoi, la quantification sans marquage, dite *label-free*, a été explorée ces dernières années. Du fait de l'absence de réactif de marquage, cette quantification permet de comparer un nombre infini d'échantillons quelle que soit leur nature (tissus, cellules).

La quantification *label-free* se base sur différentes méthodes d'estimation de l'aire du signal ou sur le nombre de fragmentations réalisées pour une espèce donnée en spectrométrie de masse. La comparaison des signaux de la même espèce à travers différentes conditions donne accès à une information quantitative relative. Parmi les méthodes de quantification *label-free* nous citons le décompte des spectres MS/MS nommé *spectral count*, et la mesure de l'aire sous les pics du signal MS, nommée AUC (*Area Under the Curve*) ou XIC (*eXtracted-Ion Chromatogram*).

II.3.2 La quantification des PTMs : défis et considérations générales

En investiguant la signification biologique d'une PTM, il est souvent avantageux de pouvoir caractériser sa quantité absolue ou relative. Ceci permet de comparer le comportement de la modification à travers une gamme de conditions biologiques pour élucider son rôle. Les développements en spectrométrie de masse présentés dans la partie

précédente ont permis de surmonter un nombre important d'obstacles. Cependant, ceci n'est pas le cas des PTMs, puisque leur analyse pose des défis différents. Parmi les différences rencontrées, nous pouvons penser immédiatement au nombre d'espèces utilisées pour établir une donnée quantitative pour une protéine *vs.* ses versions modifiées par des PTMs (ou protéoformes). En effet, plusieurs peptides sont souvent disponibles pour déterminer la quantité relative ou absolue d'une protéine, conférant ainsi de la robustesse à l'information générée. Cependant, dans le cas d'une PTM, seul le peptide contenant le site modifié permet d'établir une donnée quantitative.

Les peptides modifiés sont souvent peu abondants et nécessitent une étape d'enrichissement pour atteindre la gamme dynamique réalisable en spectrométrie de masse. D'autre part, les modifications apportent souvent des changements aux propriétés physico-chimiques d'un peptide. Par exemple, les peptides glycosylés et phosphorylés peuvent être très hydrophiles et en faible interaction avec les phases stationnaires C_{18} utilisées conventionnellement. Le changement des propriétés physico-chimiques et les faibles abondances peuvent rendre difficile l'obtention de spectres de fragmentation informatifs en spectrométrie de masse.

La différence dans les défis qui se posent s'étend jusqu'à l'étape de traitement des données acquises. L'identification des protéines à partir des spectres de fragmentation des peptides est une procédure robuste et à haut débit, un large panel d'outils bio-informatiques est disponible. A l'inverse, l'identification des PTMs sur un site s'effectue le plus souvent en utilisant le spectre de fragmentation d'un seul peptide. Et même si les principes d'estimation de la confiance obtenue sur l'identité du peptide sont identiques que ceux appliqués pour une protéine, une échelle de confiance supplémentaire est souvent nécessaire afin de valider la localisation du site modifié. La présence d'une modification influe généralement sur le profil de fragmentation et la validation statistique appliquée pour l'interprétation des spectres MS/MS est souvent faussée.

L'exploitation des données générées possède également sa part de défis spécifiques. Peu de logiciels dédiés à des types spécifiques de PTMs sont disponibles. L'exploitation des données passe souvent par des algorithmes 'maison'. D'autre part, des considérations doivent être prises en compte. Souvent, les PTMs sont présentes à des niveaux sous-stœchiométriques par rapport à la protéine non modifiée. Une augmentation de la quantité absolue du peptide modifié peu aussi bien correspondre à une augmentation de l'expression de la protéine qu'à une augmentation de l'occupation du site (*site occupancy*) ou à la

stœchiométrie de la modification. Il est ainsi nécessaire de corrélérer l'information quantitative de la modification à l'information du niveau d'expression de la protéine.

II.3.3 Discussion

Les années 2000 furent riches en avancées qui ont permis à la spectrométrie de masse de s'imposer en tant qu'outil incontournable dans les études en protéomique. La richesse des approches quantitatives disponibles signifie que plusieurs solutions sont envisageables aux problématiques traitées. Un bilan de l'ensemble de ces approches a été établi dans une revue par Bantscheff et al. [146]. La Figure 23 tirée de cet article illustre bien la différence entre ces approches, en corrélation notamment avec l'étape à partir de laquelle les différents échantillons sont réunis et les sources de biais possibles.

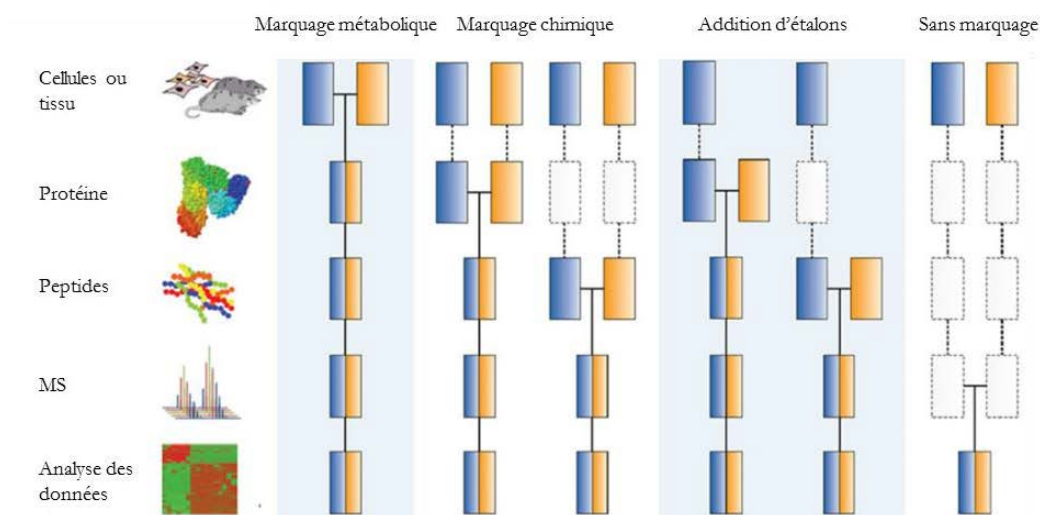


Figure 23 - Représentation schématique des méthodes quantitatives usuelles en spectrométrie de masse protéomique. Les cadres jaunes et bleus représentent deux conditions expérimentales différentes. Les lignes horizontales indiquent l'étape où les échantillons sont réunis. Les lignes pointillées représentent les étapes où des biais pourraient survenir et donc induire des erreurs dans la quantification [146].

Le choix de l'approche à adopter s'effectue en général en fonction du type d'étude, de la nature de l'échantillon, du coût de la manipulation, etc. Nous pouvons constater que globalement ces approches peuvent être scindées en deux : avec ou sans marquage.

Les méthodes *label-free* offrent la possibilité de comparer un nombre infini d'échantillons puisque la quantification n'est pas limitée par le nombre de marqueurs isotopiques disponibles. De ce fait, la quantification sans marquage possède également l'avantage d'être l'approche la moins coûteuse (au moins du point de vue de la préparation de l'échantillon) en plus d'être applicable à tout type d'échantillons. Ces méthodes

nécessitent cependant une optimisation des différentes étapes du traitement de l'échantillon à partir de l'extraction et jusqu'à l'analyse en masse de manière à réduire tout biais pouvant affecter le résultat. Ceci se réalise concrètement par une réduction du nombre de ces étapes. Cependant, l'étude des PTMs et leur quantification nécessitent souvent un nombre élevé d'étapes de manipulation comprenant des réactions de blocage et d'enrichissement, entre autres. L'augmentation du nombre de ces étapes augmente le nombre de sources de biais des approches *label-free*.

La quantification par l'introduction d'un standard marqué donne accès à une information quantitative absolue et permet en même temps la comparaison de plusieurs échantillons par normalisation. Mais cette approche est adaptée à des études ciblées. Le nombre de protéines à suivre dans des études sans *a priori* rend irréaliste l'utilisation d'une telle approche.

Les approches de marquage métabolique et chimique permettent de réunir les échantillons plus ou moins tôt dans la préparation de l'échantillon. L'analyse de plusieurs protéomes en même temps correspond à une augmentation de la complexité du mélange et de la gamme dynamique. Une augmentation de la capacité de pic en chromatographie est nécessaire. Ceci est possible grâce à des étapes de fractionnement et/ou d'enrichissement.

Dans le cas des marquages chimiques où la quantification s'effectue au niveau MS/MS (TMT, iTRAQ), l'obtention d'un seul signal pour les différents échantillons au niveau MS permet d'augmenter la sensibilité de la méthode. Cependant, cet avantage est en même temps l'inconvénient majeur de ces méthodes. La quantification au niveau MS/MS est bruitée par le phénomène de co-isolation d'ions précurseurs quasi-isobares [147]. Le signal des ions rapporteurs permettant la quantification peut contenir dans certains cas la participation d'ions contaminants co-sélectionnés pour la fragmentation. Ceci est vrai même si l'espèce d'intérêt est ultra majoritaire car les espèces quasi-isobares ultra minoritaires non détectées en MS du fait de leur faible rapport signal/bruit vont toutes produire des ions rapporteurs identiques qui s'additionnent pour donner un signal global non négligeable.

Le marquage métabolique se présente comme une approche très intéressante pour la quantification des PTMs. Effectivement, la labilité de plusieurs de ces modifications, couplée à leur hétérogénéité intrinsèque, fait de la nécessité de réduire les biais un facteur crucial dans ce type d'étude. Ici, la culture cellulaire est la seule étape où les échantillons sont préparés en parallèle. Cet aspect est particulièrement intéressant dans le cadre de l'étude des PTMs sur les cystéines où le risque d'oxydation non spécifique artéfactuel affectant spécifiquement un

échantillon constitue la source principale de biais. En revanche, la quantification se faisant au niveau MS simple, le nombre d'espèces simultanément ionisées va bien sûr augmenter proportionnellement au nombre d'échantillons comparés. La complexité du mélange va donc augmenter de façon similaire, ce qui demande 2 fois ou 3 fois la capacité de pic de l'analyse. De plus, le marquage métabolique se présente comme un très bon compromis économique se positionnant entre les méthodes *label-free* et les marquages chimiques assez coûteux. Il faut donc mettre en œuvre des techniques d'analyse de masse à haute résolution et permettant un séquençage rapide. La justesse de mesure est elle aussi indispensable pour discriminer les doublets ou les triplets corrélés.

En prenant en compte ces considérations, l'approche SILAC a été retenue dans un premier temps pour ce projet. Bien que fiable, cette méthode souffre aussi de limitations, la principale étant son application limitée aux cultures cellulaires, et plus spécifiquement celles auxotrophes aux acides aminés utilisés pour effectuer le marquage. Mais pour une étude a) quantitative, b) sans *a priori*, c) sur des modifications labiles et d) dans le cadre d'une approche fondamentale pour caractériser les voies redox cellulaires, le marquage métabolique constitue pour nous un choix adéquat et sûr.

Et en prenant en compte les limitations du marquage métabolique, le marquage chimique se présente comme une première alternative. Ainsi, afin de pouvoir proposer ultérieurement des stratégies applicables aux études des tissus et des biopsies d'organes, le marquage chimique sera également exploré dans un deuxième temps.

II.4 Détection et quantification des modifications redox sur les cystéines

La découverte de l'importance du rôle des dérivés réactifs dans la transduction de signal et l'expression génétique, et du rôle clé des cystéines dans la médiation de ces processus ont mené à des développements successifs de méthodes biochimiques et analytiques ayant pour but de caractériser l'état redox des cystéines. Ces méthodes emploient une grande variété d'approches, de réactifs et de techniques. Ainsi, nous distinguerons dans la suite les méthodes qui identifient l'oxydation au niveau de la protéine et celle qui caractérisent finement le résidu oxydé. Certaines méthodes se basent sur des marquages (des cystéines réduites et/ou oxydées), d'autres non. Les techniques employées comprennent notamment la spectrométrie de masse, l'immunoaffinité et la fluorescence. Mais avant, il est nécessaire de

porter l'attention sur quelques considérations à prendre en compte lors de l'identification de l'état redox des cystéines au niveau du protéome.

II.4.1 Considérations générales

L'analyse et la caractérisation de l'état redox des cystéines a connu des développements majeurs durant la dernière décennie. Cependant, ce type d'études fait toujours face à un nombre de défis. Une première limitation provient de la grande hétérogénéité intrinsèque des formes oxydées. Les modifications les plus importantes citées dans la partie précédente ne représente que la partie émergée de l'iceberg.

Une autre limitation provient de la labilité de certaines modifications sur les cystéines. Si certaines cystéines sont très peu réactives, d'autres sont très sensibles aux conditions environnantes, ce qui souligne le rôle des cystéines en tant qu'interrupteurs et le caractère du protéome en tant qu'entité dynamique influencée par l'état de l'exposome à un moment bien défini. La réactivité d'une cystéine est directement liée à son pKa car ce résidu est particulièrement réactif lorsque sa fonction thiol est déprotonée. Le pKa n'est pas la seule donnée influençant la réactivité d'une cystéine, comme le montre la vitesse de réaction de H_2O_2 avec la cystéine catalytique de la peroxirédoxine-2 (pKa~5-6) qui est 10^6 fois plus importante qu'avec celle de la protéine tyrosine phosphatase PTP1B (pKa 5,4) [148].

Une source importante de perturbation de l'état redox des cystéines est l'oxydation non spécifique par l'oxygène atmosphérique et par d'autres agents oxydants, lors de la préparation de l'échantillon. Une autre source provient de l'échantillon lui-même qui contient des réductases pouvant modifier l'état redox initial de la cystéine. Afin de limiter ce phénomène, il convient de travailler en condition acide ($\text{pH} < 3$) aux moments clés de la préparation de l'échantillon tels que l'étape d'extraction des protéines. Cette technique de *quenching* à l'acide est réalisée souvent avec l'acide trichloroacétique (TCA) et permet de maintenir les thiols protonés pour limiter leur réactivité. Des enzymes métabolisant les ROS peuvent être ajoutées également.

La caractérisation de l'état redox des cystéines se base souvent sur le marquage différentiel des cystéines réduites ou oxydées, ou séquentiellement réduites puis oxydées par une variété d'agents alkylants comportant des fonctions maléimide, iodoacétamide et thiosulfate. Lors du marquage des cystéines réduites, ces méthodes se basent sur le postulat que l'agent alkylant ne réagit pas avec les cystéines oxydées. Les agents alkylants peuvent également avoir une accessibilité limitée à certaines cystéines pendant le blocage des cystéines

réduites et avant l'utilisation d'agents réducteurs. La première étape d'alkylation doit donc être réalisée en présence d'agents chaotropiques et détergents facilitant l'accès aux différentes cystéines. Ces agents doivent être compatibles avec la spectrométrie de masse lorsque c'est la méthode choisie pour la détection. Par ailleurs, la lyse cellulaire et l'extraction des protéines ne conservent pas l'information de distribution des protéines dans les différents compartiments cellulaires. L'information d'état redox selon la localisation subcellulaire est de ce fait perdue. Il est possible d'utiliser de petits agents de marquage pouvant pénétrer dans la cellule pour cibler les cystéines *in vivo* afin d'obtenir un instantané (*snapshot*) de l'état redox cellulaire [149]. Bien que très élégantes, ces méthodes n'en sont pas moins à leurs prémices. Les agents de marquages peuvent perturber et influencer le déroulement de certains processus biologiques. L'accessibilité des agents alkylants à leurs cibles est aussi réduite en l'absence de détergents et d'agents chaotropiques.

II.4.2 La quantification des modifications redox sur les cystéines : Etat de l'art

La complexité de la chimie des cystéines et des modifications sur ces résidus va de pair avec la richesse des méthodes actuellement disponibles pour leur caractérisation. Ces méthodes peuvent être classées en fonction de l'approche adoptée (caractérisation des cystéines oxydées et/ou réduites, caractérisation de l'état redox moyen de la protéine, ou plus finement des différents résidus cystéines, etc.), en fonction de la technique de détection (spectrométrie de masse, immunodétection, etc.) ou en fonction de la modification recherchée (les modifications réversibles globalement, nitrosylation, glutathionylation, etc.). Dans cette partie nous nous focaliserons sur une description des approches employant la spectrométrie de masse, qui est de loin la technique la plus utilisée dans les études sans *a priori*.

En ce qui concerne la détection de cystéines dans un état d'oxydation spécifique (réversiblement oxydées en général, réduites, nitrosylées, etc.), la procédure employée comprend souvent un marqueur isotopique permettant de les différencier en spectrométrie de masse. Quand le but est de détecter et quantifier des cystéines aussi bien oxydées que réduites, le marquage différentiel s'impose comme l'approche la plus utilisée. Dans ce cas les cystéines réduites sont bloquées dans un premier temps par un agent alkylant (IAM, NEM, etc.) introduit à l'échantillon dans un tampon non réducteur pour conserver l'information sur les cystéines oxydées. Une fois le premier agent alkylant éliminé (précipitation acide, etc.), les cystéines oxydées sont réduites (DTT, TCEP, etc.). L'agent réducteur est ensuite éliminé et

un deuxième agent alkylant est introduit marquant les cystéines nouvellement réduites, permettant de les différencier par leur masse.

Dans certaines études, le but est de caractériser finement certaines modifications réversibles (nitrosylation, glutathionylation, acide sulfénique, etc.). Dans ce cas la réduction de ces modifications avant leur alkylation peut s'effectuer par des agents réducteurs spécifiques de la modification étudiée : l'arsenite pour réduire spécifiquement les acides sulféniques, la glutarédoxine pour réduire les glutathionylations, l'ascorbate pour réduire les nitrosylations, etc. D'un autre côté il est également possible d'introduire un réactif réagissant spécifiquement avec une forme modifiée, comme les dérivées de la dimédone pour la caractérisation des thiols sulféniques. Paulsen et al. présentent tous ces réactifs spécifiques par modification dans une revue détaillée et très complète [116].

La partie suivante présentera les principales approches qui ont été développées dans le cadre des études du redoxome des cystéines. Une comparaison entre ces différentes méthodes ainsi qu'une discussion sur les atouts et les faiblesses qui résident toujours dans ce type d'étude s'effectuera dans la partie discussion.

II.4.2.1 OxICAT

Afin de décrire les changements de l'état redox des cystéines d'une manière quantitative, Leichert et al. [150] adaptent la quantification des protéines par marquage chimique ICAT à une stratégie de piégeage différentiel des thiols oxydés et réduits. Les réactifs ICAT [138] avaient déjà été employés dans le but de caractériser l'état redox des résidus cystéines par Sethuraman et al. [151], mais leur stratégie permettait de détecter les cystéines réduites uniquement et d'estimer les changements en fonction de la diminution du signal de celles-ci dans des cas d'oxydation.

La stratégie OxICAT se résume ainsi : les cystéines réduites d'un extrait de protéines en suspension dans un tampon non réducteur sont marquées par un réactif ICAT léger comportant une fonction iodoacétamide, un bras espaceur et une biotine clivable. Les cystéines oxydées sont ensuite réduites. Les cystéines nouvellement accessibles sont ensuite marquées par la version lourde du réactif ICAT incorporant une différence de masse de +9 uma via des isotopes lourds (^{13}C) dans son bras espaceur. Suite à une digestion par la trypsine les peptides contenant des cystéines oxydées et réduites marquées sont enrichis sur une colonne streptavidine et la fraction enrichie est analysée en LC-MS. La Figure 24 résume le protocole de la stratégie OxICAT.

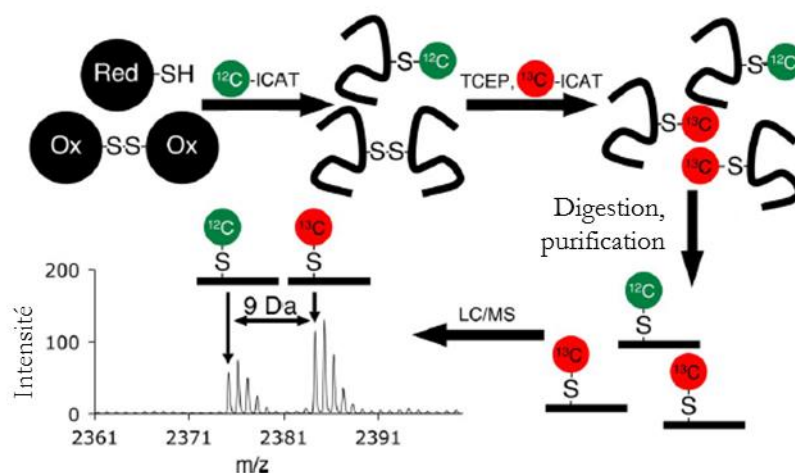


Figure 24 - Représentation schématique du protocole expérimental de la stratégie OxICAT. Le protocole comprend une étape de marquage différentiel des résidus cystéines selon leur état d'oxydation avec les deux réactifs ICAT disponibles. Le réactif lourd incorpore une différence de masse de 9 uma comme le montre le spectre de masse [150].

Les peptides de même séquence primaire marqués avec les versions lourde et légère du réactif ICAT possèdent la même efficacité d'ionisation. Il est donc possible de comparer les signaux relatifs au peptide contenant la cystéine oxydée (ICAT ^{13}C) et celui contenant la cystéine réduite (ICAT ^{12}C), donnant ainsi accès au rapport oxydé/réduit (ox/red). La somme des intensités permet également d'obtenir l'information de pourcentage de chacune des deux formes par rapport au total (ox/[ox+red]).

II.4.2.2 La technique *biotin switch*

Technique introduite par McDonagh et al. [152], elle se base sur un piégeage différentiel des cystéines libres et oxydées. Les cystéines libres sont bloquées par alkylation au NEM, alors que les cystéines réversiblement oxydées sont alkylées par un réactif spécifique des groupements sulfhydryles, le N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamide ou biotine HPDP (Figure 25). Ce réactif permet d'effectuer une réaction de biotinylation à des pH entre 6 et 9 via son groupement pyridyldithio réagissant avec les thiols libres pour former des ponts disulfure.

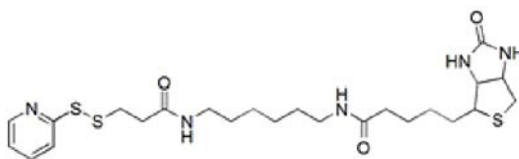


Figure 25 - Formule semi-développée de la biotine HPDP. La réaction entre le groupement 2-pyridyldithio avec un thiol libre mène à la formation d'un pont disulfure et la libération d'une molécule de 2-mercaptopyridine.

Suite à la digestion des protéines, des colonnes de streptavidine immobilisée permettent de retenir sélectivement les cystéines oxydées marquées avec la biotine. L'action d'un agent réducteur permet de réduire les ponts disulfure peptide-biotine HPDP et d'éluer les peptides enrichis. Les cystéines initialement oxydées sont détectées par spectrométrie de masse sous forme réduite. La Figure 26 résume le protocole de cette approche.

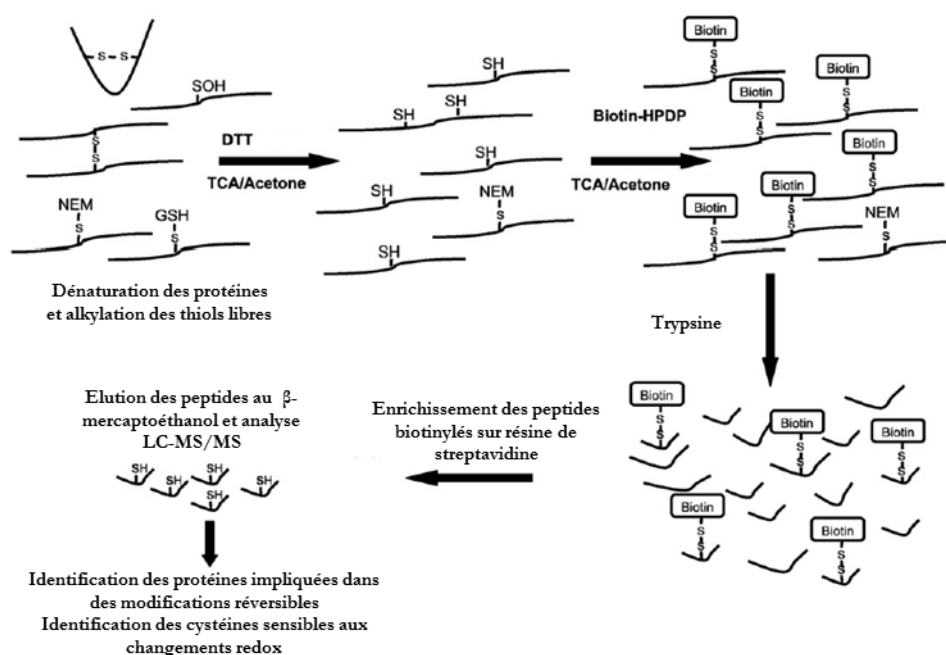


Figure 26 - Résumé du protocole suivi pour enrichir les cystéines oxydées sélectivement en utilisant la technique de *biotin switch* [152].

En enrichissant sélectivement les cystéines oxydées, cette approche permet d'augmenter la couverture de ces espèces souvent peu abondantes.

II.4.2.3 OxiTRAQ

En 2013, Liu et al. [153] proposent la stratégie OxiTRAQ qui combine une approche de marquage différentiel à la quantification par *tags* isobariques. Le marquage différentiel se base sur la technique *biotin switch* où les cystéines réduites sont bloquées par un agent alkylant et les cystéines oxydées sont marquées à la biotine HPDP. Suite à l'étape d'enrichissement, le marqueur biotine est éliminé par réduction et la fraction des peptides enrichis est marquée par un réactif iTRAQ. Lorsque le but est de comparer plusieurs échantillons, la fraction provenant de chaque condition est marquée par un réactif iTRAQ différent. L'ensemble des conditions à comparer est analysé en même temps en LC-MS. Le résumé de l'approche OxiTRAQ est présenté dans la Figure 27.

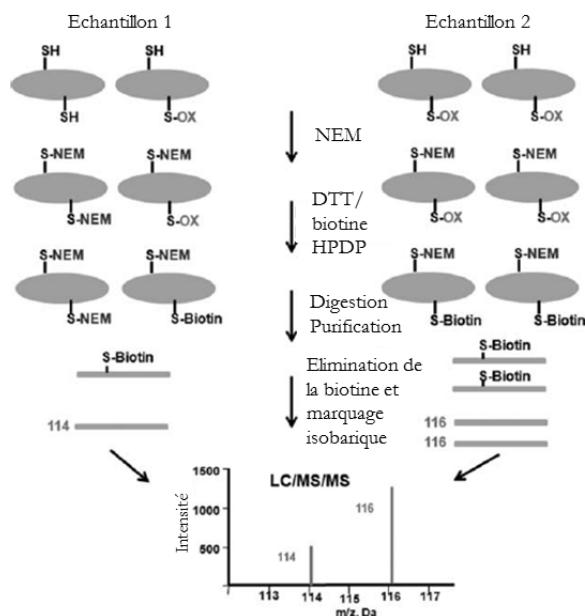


Figure 27 - Représentation schématique du protocole de la stratégie OxiTRAQ. Le protocole comporte une alkylation différentielle des cystéines libres et oxydées avec enrichissement sélectif des cystéines oxydées. Suite à la digestion, le marquage des peptides enrichis par des réactifs iTRAQ permet d'obtenir une information quantitative relative. Les intensités des pics rapporteurs dans le spectre MS/MS reflètent l'abondance d'une cystéine oxydée dans chacune des conditions étudiées [153].

L'avantage que présente cette approche par rapport à l'approche *biotin switch* classique est de s'affranchir des biais qui pourraient survenir suite à l'analyse séparée des différentes conditions. La sensibilité est elle aussi augmentée grâce à l'analyse simultanée des différents échantillons.

II.4.2.4 OxMRM

Afin d'augmenter la sensibilité et la couverture du redoxome, Held et al. développent la méthode OxMRM [154]. A la différence des autres méthodes présentées jusqu'ici, la méthode OxMRM adopte une approche ciblée, en employant toujours un marquage différentiel des cystéines réduites et oxydées. Suite à l'extraction des protéines, l'échantillon est soumis à un enrichissement sélectif d'une protéine d'intérêt (la protéine P53 dans le cas de Held et al.) par immuno-affinité. L'étape suivante consiste en une alkylation par NEM. Suite à la réduction des cystéines réversiblement oxydées, ces dernières sont bloquées par une version lourde du NEM (NEM d₅, contenant 5 deutériums). Le résumé du protocole employé est présenté dans la Figure 28.

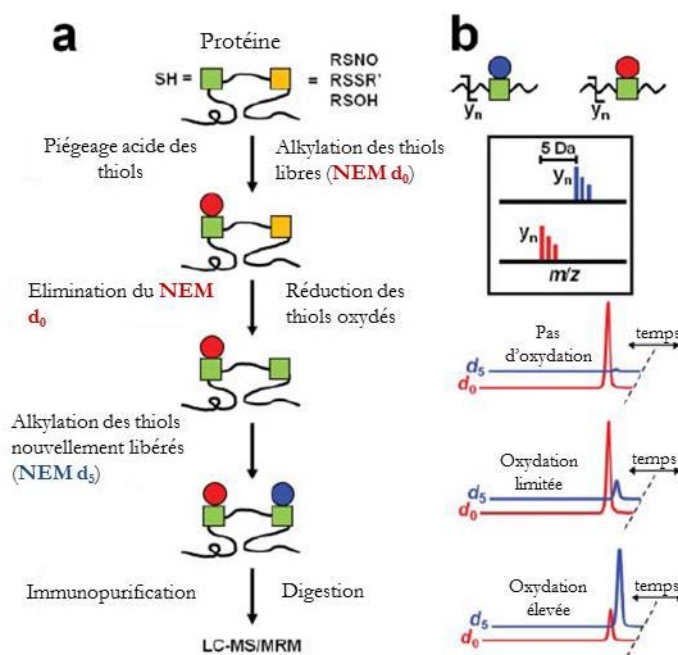


Figure 28 - Schéma résumant le protocole expérimental de la méthode OxMRM (a) Alkylation différentielle au NEM lourd (d_5) et léger (d_0) suivie de l'immunopurification de la protéine d'intérêt. (b) Analyse ciblée effectuée sur un instrument triple-quadripôle. Cette configuration d'instrument permet la sélection d'un précurseur dans le premier quadripôle, sa fragmentation dans le deuxième et le suivi de fragments caractéristiques par le troisième quadripôle. Ce type d'analyse ciblée permet le suivi de transitions uniques et la distinction entre les cystéines marquées au NEM d_5 et celles marquées au NEM d_0 [154].

En plus de l'enrichissement par immuno-affinité de la protéine d'intérêt, la méthode OxMRM, comme son nom l'indique, emploie une approche ciblée dite *Multiple Reaction Monitoring* (MRM ou plus couramment SRM pour *Selected Reaction Monitoring*) pour détecter les peptides par spectrométrie de masse. Ce mode d'acquisition permet l'isolation sélective d'un précurseur préalablement déterminé et caractérisé (m/z , charge, temps de rétention en LC, énergie de collision, fragments les plus intenses, etc.). Ce mode très sélectif permet d'atteindre une gamme dynamique et des seuils de sensibilité plus importants que ceux possibles avec un mode de balayage non ciblé.

II.4.2.5 Le marquage différentiel par *Tandem Mass Tags* (TMT)

Récemment, un nouveau type de *tandem mass tags* (TMT) spécifique des fonctions thioles a été développé : l'iodoTMT, nommé ainsi pour sa fonction iodoacétamide utilisée pour effectuer le marquage. Les différentes versions isobariques de ce réactif ont été employées afin de piéger différentiellement les cystéines réduites et oxydées dans un échantillon [142]. Dans l'étude où cette approche a été développée, les cystéines réduites sont bloquées par un agent alkylant (IAM), les cystéines nitrosylées spécifiquement réduites dans un premier

temps par l'ascorbate et marquées par un premier réactif TMT (TMT_1) alors que le reste des cystéines oxydées est réduit au TCEP et marqué par un deuxième réactif TMT (TMT_2). Ce protocole est appliqué en parallèle à plusieurs conditions à comparer comme le montre la Figure 29. L'analyse des différents échantillons effectuée en même temps est une des forces de cette approche.

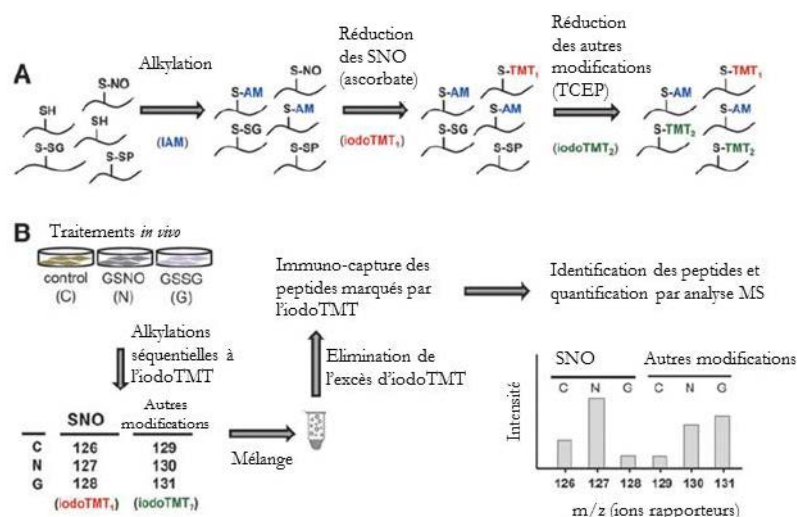


Figure 29 - Schéma résumant le protocole expérimental du marquage séquentiel des cystéines à l'iodoTMT afin de suivre et quantifier plusieurs modifications réversibles simultanément. (A) La première étape du protocole consiste en une alkylation de toutes les cystéines libres, suivie d'une réduction spécifique des cystéines nitrosylées et du marquage de ces cystéines par un premier réactif iodoTMT (iodoTMT_1). Les autres modifications réversibles sont ensuite réduites à leur tour et marquées par un autre réactif iodoTMT (iodoTMT_2). (B) Le réactif existe en 6 versions, il est ainsi possible de comparer jusqu'à trois échantillons différents. Dans cet exemple des cellules traitées au GSNO (N) ou au GSSG (G) sont comparées à des cellules contrôle (C). Abréviations - S-SG : glutathionylation, S-NO : nitrosylation, S-SP : pont disulfure, GSNO : S-nitrosoglutathion, GSSG : disulfure de glutathion [142].

En plus de l'analyse simultanée des différentes conditions par spectrométrie de masse, cette méthode permet d'accomplir un gain en sensibilité grâce à un enrichissement par immuno-affinité des cystéines marquées au réactif iodoTMT (anticorps anti-TMT).

II.5 Autres techniques pour la caractérisation des cystéines

Il est évident d'après la partie précédente que la spectrométrie de masse se positionne comme étant la méthode phare dans l'analyse et la caractérisation du redoxome des cystéines. Cependant, il convient de noter que la spectrométrie de masse n'est pas la seule technique employée dans ce type d'étude. En effet, selon l'information recherchée, d'autres approches peuvent être employées.

La majorité des approches alternatives se basent sur une détection des protéines contenant des résidus cystéines réduits ou oxydés suite à leur séparation sur un gel d'électrophorèse (mono ou bidimensionnel). Ces méthodes s'inspirent de l'approche DIGE (*Difference gel electrophoresis*) employée en protéomique en l'adaptant pour répondre aux problématiques redox. Ainsi, les résidus cystéines réduits et oxydés sont marqués différemment par des réactifs permettant de caractériser leur état redox.

Parmi les réactifs utilisés, citons les fluorophores maléimides. Dans ce cas les cystéines réduites sont marquées par un premier fluorophore, alors que les cystéines oxydées sont réduites puis marquées par un deuxième fluorophore émettant dans une région de longueur d'onde différente. L'extrait de protéines est séparé sur gel d'électrophorèse et la détection se fait par fluorescence, en superposant les émissions des deux fluorophores comme le montre la Figure 30 [155].

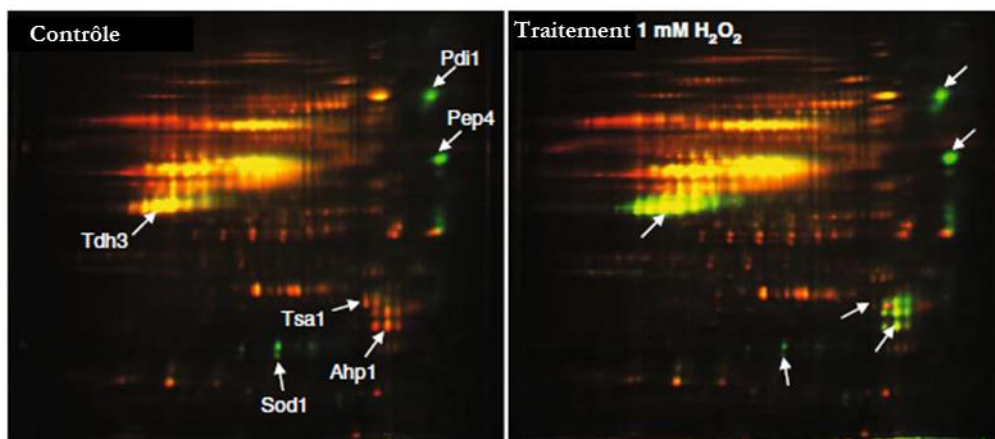


Figure 30 - Séparation par gels d'électrophorèse 2D d'extraits de protéines de levure où les thiols libres et oxydés sont marqués différemment par des fluorophores à longueurs d'onde d'émission distinctes. Dans ces images les thiols libres ont été marqués au DYE680 (rouge). Suite à la réduction au DTT, les cystéines réversiblement oxydées sont marquées au DYE780 (vert). La présence des deux fluorophores est observée comme une émission jaune. L'image à gauche représente l'extrait du contrôle non traité, alors que l'image à droite représente la même souche ayant subi un traitement au peroxyde d'hydrogène (1 mM, 2 minutes). L'image montre la superoxyde dismutase (Sod1) et la protéine disulfure isomérase (Pdi) entièrement oxydées. Autres protéines identifiées : les peroxyrédoxines Tsa1 et Ahp1, la saccharopepsine (Pep4) et la glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogénase 3 (Tdh3) [155].

Le même protocole peut être modifié en remplaçant le marquage par un fluorophore maléimide par un marquage au NEM contenant un isotope radioactif (^{14}C). Dans ce cas, la détection des protéines contenant les résidus oxydés ou réduits marqués s'effectue en détectant la radioactivité [155].

Les méthodes se basant sur une caractérisation de l'état redox des protéines suite à leur séparation sur gel d'électrophorèse peuvent aussi employer une stratégie ciblée. Dans ce cas, la détection des protéines oxydées s'effectue par le biais d'anticorps spécifique par *Western Blot*. Ce type d'approche peut aussi bien cibler un type particulier de modification à travers le protéome, comme la détection des protéines S-glutathionylées séparées sur gel non réducteur [156], qu'une protéine spécifique portant une modification bien déterminée, comme la détection de la forme sulfinique des protéine-tyrosine phosphatases [157].

Finalement, des méthodes simples n'employant pas de marquage peuvent être utilisées pour détecter les ponts disulfure intermoléculaires. La plus connue de ces méthodes est l'électrophorèse diagonale. Cette méthode consiste à effectuer une migration des protéines d'un extrait sur gel d'électrophorèse dans des conditions non réductrices dans un premier temps. La bandelette s'étalant sur toute la gamme de masse du gel est entièrement prélevée et déposée horizontalement au-dessus d'un deuxième gel afin d'effectuer une deuxième migration, cette fois dans des conditions réductrices. La majorité des protéines migrent selon la même masse moléculaire apparente dans les deux conditions traçant ainsi une diagonale. Cependant les protéines impliquées dans des ponts disulfure migrent à des masses moléculaires supérieures dans les conditions non réductrices s'écartant ainsi de la diagonale durant la deuxième migration, comme le montre la Figure 31.

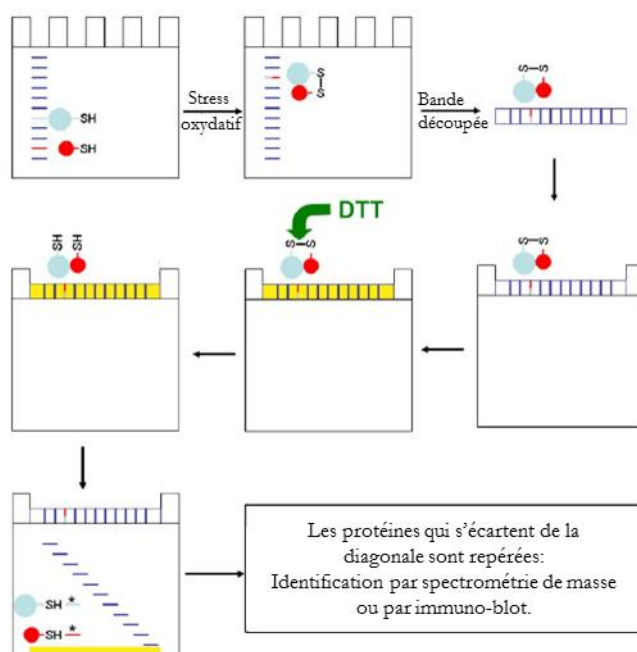


Figure 31 - Représentation schématique des différentes étapes de l'électrophorèse diagonale pour l'identification des ponts disulfure intermoléculaires [158].

II.6 Discussion

Quelques-unes des méthodes de détection et quantification du redoxome des cystéines les plus utilisées ont été présentées dans la partie précédente. Cette liste est loin d'être exhaustive puisque plusieurs autres variantes, et d'autres approches, existent en fonction de la question biologique et de l'information recherchée. Ces méthodes se sont démontrées efficaces non seulement dans l'identification de résidus cystéines jouant un rôle central dans la médiation de signal et le maintien de l'homéostasie redox, mais également dans la quantification des changements engendrés par une variété de stimuli et de conditions [159], [152].

Cependant, la nature de la problématique en question rend quasi impossible de trouver une solution universelle adaptée pour tous les cas. Les méthodes détaillées jusqu'ici présentent toutes des atouts, mais possèdent également chacune leurs propres écueils. L'absence d'anticorps pouvant reconnaître les résidus cystéines oxydés rend impossible d'opter pour une stratégie *divide et impera* afin d'enrichir sélectivement les protéines portant ces résidus [112]. Et même si des anticorps dirigés contre certaines modifications précises (S-glutathionylation) existent, ces anticorps souffrent du problème de réactivité croisée. L'immuno-reconnaissance présente donc quelques avantages dans les études ciblées mais n'est pas adaptée aux études sans *a priori*.

La spectrométrie de masse se présente comme une excellente alternative, avec ses propres limitations. En effet la spectrométrie de masse n'est pas intrinsèquement quantitative et reste très limitée en gamme dynamique. Cependant, cette technique possède certains avantages. Les développements de cette technologie depuis le début du XXI^{ème} siècle ont permis d'apporter une variété de solutions à la question de la quantification. Un large panel d'outils existe ce jour pour quantifier les protéines, et les PTMs qu'elles portent. La grande probabilité de retrouver des distributions d'états redox sur une cystéine avec une dynamique élevée de ces différents états au sein d'une même protéine dans un même échantillon rend incontournable l'enrichissement des différentes formes pour pouvoir détecter les moins abondantes parmi elles.

La stratégie OxICAT (§II.4.2.1 page 88) figure parmi les approches les plus couramment utilisées dans les études redox. Cette méthode comprend une étape d'enrichissement des cystéines. Cependant, étant donné que les résidus oxydés et réduits sont marqués avec le même réactif ICAT (dans ses deux versions différentes : lourde et légère), toutes les cystéines sont enrichies en même temps. Or, les cystéines réduites sont bien souvent plus abondantes au niveau du protéome. L'enrichissement simultané de tous les résidus quel que soit leur état

d'oxydation défavorise la détection des résidus oxydés, moins abondants. La stratégie OxMRM permet d'atteindre de bons seuils de sensibilité en associant enrichissement de protéine et analyse ciblée en spectrométrie de masse, mais cette stratégie ne s'applique pas aux études sans *a priori* dont le but est d'identifier de nouvelles cibles des modifications redox sur les cystéines.

Généralement, les études dédiées à la quantification des PTMs s'intéressent principalement à la caractérisation de la fraction modifiée et à ses variations à travers un nombre de conditions biologiques d'intérêt. Cependant, ces modifications ne peuvent pas être étudiées indépendamment du changement du niveau d'expression de la protéine qui porte la PTM étudiée. Une augmentation de la quantité absolue d'un peptide modifié peut aussi bien provenir d'une augmentation de la fraction stœchiométrique de la modification (*site occupancy*) que d'une simple augmentation du profil d'expression de la protéine. Des cas plus complexes comportant des changements antagonistes de stœchiométrie de la modification et du niveau d'expression peuvent survenir, compliquant encore plus l'interprétation des résultats. Aucune des méthodes décrites ci-dessus ne permet l'estimation du niveau d'expression de la protéine, sauf si les échantillons sont analysés séparément, ce qui introduit cependant un biais pour les modifications les plus labiles. La méthode OxICAT s'affranchit de l'information de profil d'expression pour estimer la stœchiométrie de la modification puisque les fractions modifiée (ox) et non modifiée (red) sont toutes les deux quantifiées : $\%ox = (ox/[ox+red])$. Mais l'information de profil d'expression reste une donnée importante dans l'analyse des voies de signalisation impliquées par exemple. La nécessité d'obtenir cette information a poussé certains groupes à modifier la procédure OxICAT pour inclure une étape de marquage chimique supplémentaire des peptides par des réactifs iTRAQ augmentant cependant considérablement le coût de la procédure (deux marquages chimiques) [160], en ajoutant un biais supplémentaire dû à cette étape de marquage.

Cette notion d'occupation de site prend progressivement de plus en plus de l'importance dans les études de PTMs, surtout dans les études appliquées au phosphoprotéome [161].

Proposer des nouvelles stratégies analytiques pour répondre à ce problème est au cœur de ce projet de thèse. Ce travail a permis de mettre en place une méthodologie permettant de i) finement identifier au sein du redoxome des cystéines les sites de modifications et de ii) quantifier ces PTMs tout en enrichissant les espèces les moins abondantes, en maintenant un coût raisonnable pour la procédure.

L'état redox de la cellule est-il la conséquence d'une sur (sous) expression de protéines oxydées ou d'une sur (sous) oxydation de protéines sans modification du niveau d'expression ? Est-ce une modulation de l'état redox individuel d'une protéine par oxydation ou est-ce une modulation de l'état redox global du protéome par surexpression de cette protéine?

Partie II : Résultats et discussions

Organisation de la partie

Le développement de stratégies analytiques pour la caractérisation et la quantification des modifications post-traductionnelles sur les résidus cystéines est le cœur de ce projet de thèse. Différentes approches ont été explorées et investiguées. Cette partie est dédiée à la présentation du développement de ces méthodes ainsi que les résultats relatifs à chacune d'elles. Les deux approches principales se basent sur des principes de marquage et de quantification différents : la méthode OcSILAC, basée sur un marquage métabolique, sera présentée au Chapitre III avec ses résultats au Chapitre IV alors que la méthode OxiTMT, basée sur un marquage chimique, sera présentée au chapitre V.

Chapitre III : OcSILAC, une stratégie analytique redox basée sur un marquage métabolique

III.1 Introduction

Au cours de la dernière décennie, l'analyse protéomique globale, appelée *shotgun proteomics*, de type LC-MS/MS, est devenue la méthode de choix pour étudier le protéome d'un système biologique dans un environnement (exposome) donné. Comme nous l'avons vu au Chapitre II, les protéines subissent une digestion enzymatique afin de générer des peptides de plus faible masse qui seront analysés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (approche *bottom-up*).

Il s'agit d'identifier de la façon la plus exhaustive possible, les protéines présentes dans un échantillon, et de caractériser les modifications post-traductionnelles portées par ces protéines identifiées. Cette démarche vise à trouver des descripteurs protéiques les plus spécifiques et discriminants possibles. Elle est employée dans le but de trouver des biomarqueurs, de comprendre des mécanismes cellulaires, etc. De nos jours, les études en protéomique ne s'arrêtent plus à la notion d'absence ou de présence d'une protéine, mais s'intéressent à la modulation de la quantité de la protéine et des modifications qu'elle porte. L'identification dans un premier temps, et la quantification dans un second temps, permettent de valider les protéines et/ou les modifications candidates pour mieux comprendre les voies qui gouvernent leurs modulations.

Nous avons également vu que, dans le cadre de ce projet, la thématique d'intérêt est le redoxome des cystéines et les approches utilisées pour sa caractérisation. Cette thématique est étroitement liée aux phénomènes de stress oxydatif et à la présence endogène ou exogène des espèces réactives, notamment les ROS et les RNS. Ces espèces, et les protéines qui contrôlent leur production et élimination, sont aussi bien impliquées dans des voies pathologiques que dans des voies de signalisation et de régulation cellulaires.

Si l'analyse des protéines par spectrométrie de masse est devenue une opération de routine dans de nombreux laboratoires, l'analyse et la quantification des PTMs reste plus délicate. En effet, ce type d'étude nécessite la prise de précautions supplémentaires et spécifiques ainsi que des étapes de validation additionnelles. Ceci est particulièrement vrai

pour l'analyse du redoxome des cystéines. Les considérations à prendre en compte ont été détaillées dans le chapitre précédent.

Dans cette partie seront détaillés la démarche OcSILAC développée au cours de ce projet de thèse, ainsi que les paramètres préconisés pour chaque étape, de l'extraction des protéines au traitement bio-informatique des données. En revanche, les détails des paramètres classiques d'une analyse *shotgun*, y compris la recherche dans les banques de données, sont présentés dans la partie protocole (Annexe II : Protocoles expérimentaux).

III.2 Le protocole de la stratégie OcSILAC

Le nom choisi pour la méthode développée, **OcSILAC** - pour **Oxidized Cysteine SILAC**, est révélateur de son domaine d'application et de l'approche adoptée. La prononciation '*OC-SILAC*' fait allusion aux phénomènes d'oxydation que nous chercherons à caractériser et rappelle la stratégie de marquage métabolique. Le protocole tel qu'il a été imaginé est présenté dans la Figure 32.

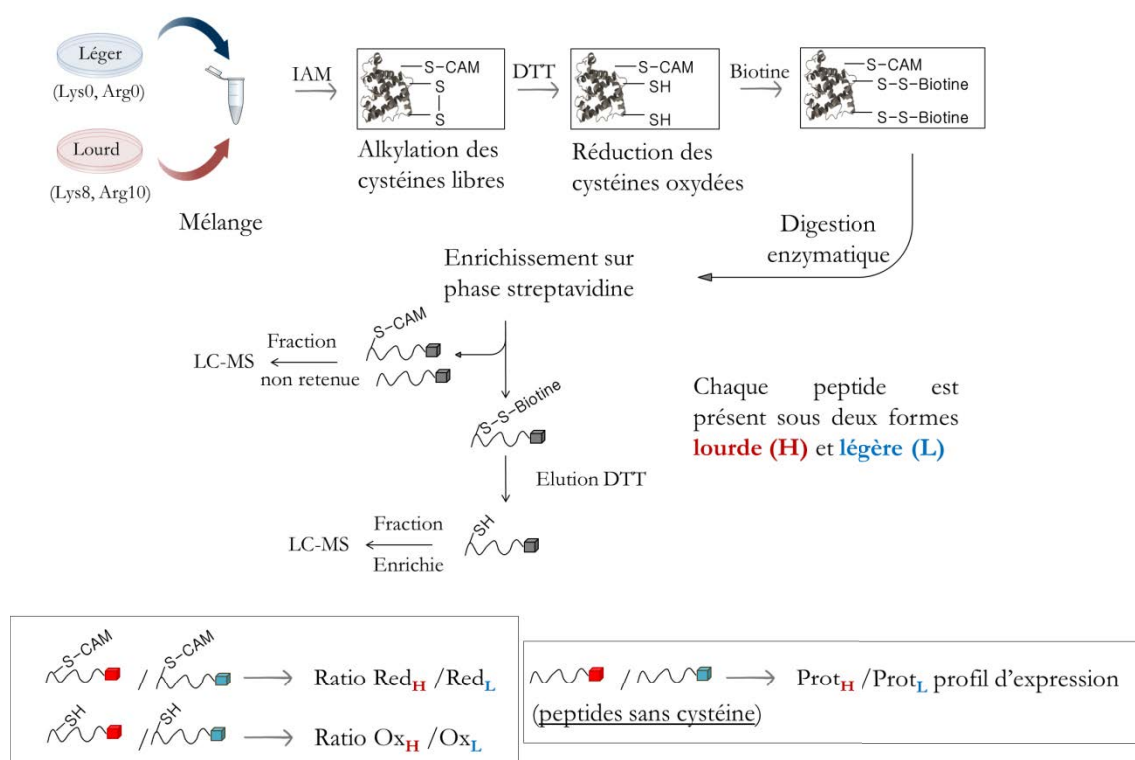


Figure 32 - Schéma résumant le protocole suivi dans la procédure OcSILAC. Afin de simplifier l'image, les protéines et les peptides sont représentés avec un code couleur gris, indiquant la présence de deux formes : **lourde** et **légère**, provenant des deux conditions comparées. Les peptides contenant une cystéine sont représentés par leur groupement thiol. Abréviations - CAM : carbamidométhyl, Red : forme réduite, Ox : forme oxydée.

Concrètement, le protocole est appliqué à deux cultures cellulaires représentant deux conditions à comparer entre elles. L'une des deux cultures est effectuée dans un milieu contenant de la lysine et de l'arginine marquées par des isotopes lourds, $^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_4$ pour l'arginine (R10) ce qui introduit une augmentation de masse de 10 Da par résidu par rapport à l'arginine non marquée, et $^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_2$ pour la lysine (K8) ce qui introduit une augmentation de masse de 8 Da par résidu lysine marqué. Suite à plusieurs cycles de division cellulaire (en général 6 minimum) assurant l'incorporation des acides aminés lourds dans la souche à marquer, un nombre équivalent de cellules de chaque culture est collecté et mélangé. L'ensemble est précipité dans de l'acide trichloroacétique (TCA) afin de limiter une oxydation artéfactuelle et de figer les cystéines dans leur état d'oxydation cellulaire.

Les protéines sont ensuite extraites par lyse en condition acide (TCA 20%) et resuspendues dans un tampon non réducteur contenant un agent alkylant, l'iodoacétamide (IAM), afin de bloquer les cystéines réduites. Après l'élimination de l'excès d'IAM, les protéines sont resuspendues dans un tampon contenant un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT), afin de réduire les cystéines réversiblement oxydées. Après l'élimination du DTT, un deuxième réactif, la biotine HPDP, est ajouté pour alkyler les cystéines nouvellement réduites par formation d'un pont disulfure cystéine-biotine.

L'excès de biotine HPDP est ensuite éliminé, et les protéines sont soumises à une digestion tryptique. Les peptides ainsi générés sont soumis à un enrichissement par affinité avec de la streptavidine greffée sur billes d'agarose. Cette étape permet d'enrichir sélectivement les peptides biotinylés, donc ceux contenant des résidus cystéines initialement oxydés. La fraction non enrichie est collectée, alors que les peptides retenus sur la colonne par affinité sont élués au DTT qui réduit les ponts disulfure formés avec la biotine.

Les deux fractions collectées sont analysées par LC-MS et les peptides sont identifiés. Rappelons que chaque peptide sera présent en deux versions : lourde et légère, chacune provenant d'une culture cellulaire. Les deux versions sont co-éluées et co-ionisées permettant d'estimer le rapport des deux espèces en comparant l'intensité des pics relatifs en MS. Le rapport des peptides contenant une cystéine carbamidométhylée représente le rapport de la forme réduite entre les deux conditions alors que le rapport des peptides contenant des cystéines détectées sous forme libre indique le rapport de la forme oxydée. Finalement, le rapport de tous les peptides protéolytiques ne contenant pas

de cystéine donne accès à l'information du niveau d'expression permettant de corriger l'information quantitative obtenue pour les résidus cystéines.

III.3 Les différentes étapes de la mise en place du protocole

Le protocole de la stratégie OcSILAC tel qu'il a été présenté comporte plusieurs étapes supplémentaires par rapport à une analyse *shotgun* classique en protéomique. Ces étapes exigent des précautions à prendre et une validation préalable assurant la préservation de l'état d'oxydation et la génération d'une donnée quantitative fiable.

Il a été décidé de mettre en place l'étude sur un modèle de levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Le Laboratoire de Stress Oxydant et Cancer (DSV, CEA) de Michel Toledano codirigeant cette thèse est spécialisé dans l'étude des voies redox chez la levure qui représente un excellent modèle des voies de signalisation chez l'Homme avec un grand nombre de protéines et mécanismes conservés. La levure présente également l'avantage de posséder un cycle de division plus rapide que les cellules humaines permettant une incorporation rapide des acides aminés lourds et donc une bonne disponibilité de matériel pour effectuer la mise au point. Dans la partie suivante, nous revenons, point par point, sur la mise en place et la validation des différentes étapes du protocole développé.

III.3.1 La souche utilisée pour la mise au point : Δ TRR1

La validation des stratégies d'analyse en protéomique redox se fait souvent par comparaison du protéome d'une culture de cellules non traitées (témoin) à celui de la même souche traitée chimiquement avec un oxydant tel que le peroxyde d'hydrogène [150]. Le peroxyde d'hydrogène oxyde d'une manière non spécifique les résidus cystéines du protéome, permettant d'observer facilement une différence entre les deux souches et valider la stratégie développée.

Pour se rapprocher des conditions d'oxydation endogènes, nous avons estimé qu'il était intéressant de développer le protocole OcSILAC sur un mutant de levure après la suppression de l'expression d'une protéine impliquée dans une voie redox. Ainsi nous avons choisi de mener l'étude sur une souche ayant subi une délétion du gène *Trr1* codant pour l'expression de la thiorédoxine réductase 1 : la souche Δ TRR1. Deux voies redox existent chez la levure : la première est la voie de la thiorédoxine qui est régénérée par la TRR, et la seconde est la voie du glutathion, ce dernier étant régénéré par la glutathion réductase. La voie de la thiorédoxine assure la régénération d'un certain nombre d'enzymes dont le fonctionnement se fait par le biais d'un centre

actif contenant une cystéine catalytique. Parmi ces enzymes figurent la ribonucléotide réductase 1 impliquée dans la synthèse de l'ADN et les peroxyrédoxines impliquées dans l'élimination des peroxydes (Figure 33).

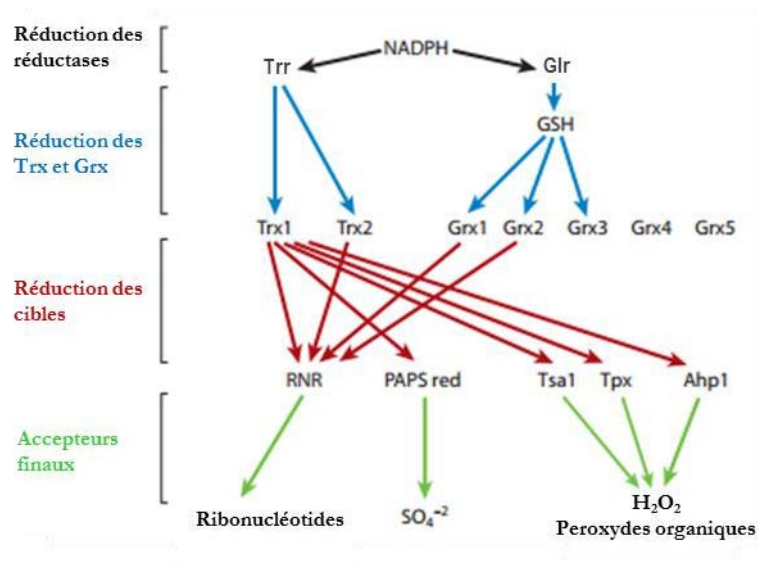


Figure 33 - Schéma simplifié des deux voies redox cellulaires et quelques-unes de leurs cibles chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) [162]. Le NADPH représente le donneur final d'électrons dans les deux cas. Abréviations - TRR : thiorédoxine réductase, GLR : glutathion réductase, TRX : thiorédoxine, GRX : glutathion réductase, RNR : ribonucléotide réductase, PAPS red : phosphoadénosine phosphosulfate réductase, TSA1 TPX et AHP1 : peroxyrédoxine.

La suppression de la TRR1 mène à l'accumulation des thiorédoxines oxydées et à un défaut de régénération de leurs cibles. La souche Δ TRR1 est viable mais possède un cycle de division plus lent que la souche sauvage ou *wild type* (WT) à cause du défaut de fonctionnement de la ribonucléotide réductase [100], [163]. La souche Δ TRR1 est également caractérisée par une accumulation d'espèces oxydantes à cause du défaut de fonctionnement des peroxyrédoxines, ce qui fait d'elle un cas intéressant afin de valider notre protocole. Cette souche sera comparée à une souche WT ne présentant pas les défauts cités.

III.3.2 Le marquage SILAC

Afin de réaliser un marquage efficace il est nécessaire que l'organisme étudié incorpore les acides aminés lourds fournis dans le milieu. La majorité des organismes supérieurs offre la possibilité d'utilisation de divers acides aminés, pour lesquels ils sont auxotrophes, afin d'effectuer ce marquage. Ceci n'est pas le cas des microorganismes, qui peuvent synthétiser la majorité des acides aminés essentiels et

qui nécessitent donc des étapes de manipulation supplémentaires pour les rendre auxotrophes pour les acides aminés désirés.

Cependant un marquage SILAC fiable peut être effectué pour certains organismes non auxotrophes comme ceci a été démontré pour la levure [164]. En effet, chez les souches de levures prototrophes, la présence d'acides aminés dans le milieu mène à une régulation négative des voies de synthèse de ces acides aminés, ce qui favorise ainsi la consommation d'acides aminés exogènes et leur incorporation d'une manière efficace. Il est également possible de modifier les souches prototrophes pour les rendre entièrement auxotrophes pour certains acides aminés, mais des marquages d'une efficacité autour de 96% même pour les souches prototrophes sont obtenus, ce qui est suffisant pour une quantification fiable. Il faut noter que les souches prototrophes que nous avons retenues dans le cadre de cette étude sont plus lentes à marquer que les souches auxotrophes.

Dans notre cas, afin d'atteindre une bonne efficacité de marquage rapidement, il est préférable d'effectuer le marquage par acides aminés lourds sur la souche WT vu les défauts que possède la souche Δ TRR1, notamment son cycle de division qui est plus lent.

Il était quand même nécessaire de contrôler la qualité du marquage. Pour cela, un extrait de protéines de la souche WT cultivée dans un milieu contenant de la lysine et de l'arginine lourdes a été traité et soumis à une analyse LC-MS. L'identification des protéines est effectuée avec le logiciel Proteome Discoverer utilisant le moteur de recherche Mascot. Les marqueurs métaboliques utilisés, à savoir la lysine K8 et l'arginine R10, sont inclus en tant que modifications variables. L'étape suivante consistait en une extraction des pics correspondant aux versions lourde (**H**) et légère (**L**) de chaque peptide avec le logiciel Pinpoint et l'estimation des aires sous les pics. L'efficacité de marquage est estimée selon l'équation :

$$\text{efficacité (\%)} = [H/(H+L)] \times 100$$

L'efficacité de marquage obtenue selon 3 répliques techniques est de $98 \pm 0,2$ %. Ce chiffre est en accord avec la valeur de 96% trouvée dans la littérature et permet d'effectuer des quantifications relatives fiables des échantillons marqués. La Figure 34 illustre un exemple de spectre MS obtenu pour un peptide issu de l'analyse du protéome de la souche marquée métaboliquement à la lysine K8 et l'arginine R10.

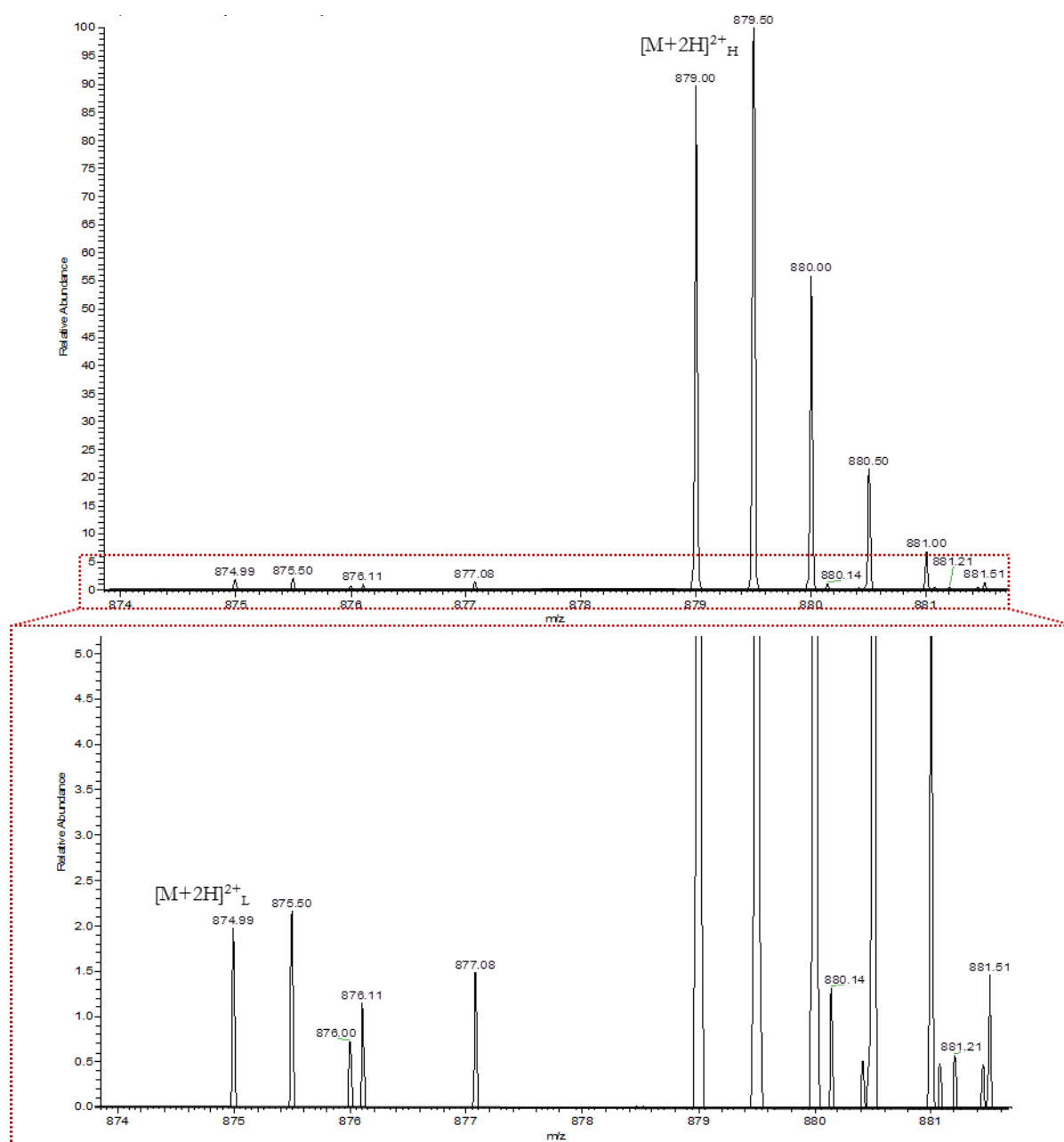


Figure 34 - Extrait d'un spectre MS montrant le signal obtenu pour le peptide GDLGIEIPAEVLAVQK (P00549|KPYK1_YEAST : Pyruvate kinase). Le pic à m/z 879.00 est le pic monoisotopique du peptide marqué (espèce bichargée), comportant une lysine K8. Le cadre rouge représente un agrandissement de la zone des intensités entre 0 et 5% du signal maximal. Le pic à m/z 874.99 est le pic monoisotopique du même peptide GDLGIEIPAEVLAVQK non marqué (écart de 4 Thomson). Le signal de la fraction résiduelle non marquée représente $\sim 2\%$ du signal de la fraction marquée dans ce cas.

III.3.3 L'extraction des protéines

Différents protocoles d'extraction des protéines existent pour la levure. Ces protocoles sont conçus pour désorganiser la paroi cellulaire résistante composée de β -glucanes, chitine et glycoprotéines [165]. Ceci est possible par action mécanique, comme l'action des billes de verre ou les cellules de pression *french press*, assistée par des agents chimiques. Parmi ces agents chimiques, les réducteurs tels que le DTT ne peuvent pas être utilisés à cette étape dans les études redox. En outre, il est nécessaire de se placer à un pH acide afin de conserver l'information redox sur les cystéines. Dans ce cadre, l'action mécanique des billes de verre est une solution adéquate. Il s'agit d'une méthode simple, robuste [166] et adaptée à l'extraction en milieu acide. Les ultrasons et les autres méthodes générant de la pression sont évités pour limiter les réactions d'oxydation non spécifique. En effet, les ondes ultrasons créent des microenvironnements où les conditions de température et de pression peuvent atteindre 5000° C et 1000 bar. Ces conditions sont délétères pour l'échantillon.

L'extraction par billes de verre s'effectue par ajout d'un volume équivalent à 600 μ L environ de billes + 600 μ L d'une solution aqueuse d'acide trichloroacétique 20% (v/v). Les billes agissent par agitation de l'échantillon au vortex à température ambiante pendant une minute suivie d'une minute de refroidissement dans un bain de glace pour éviter tout réchauffement. Ce cycle est répété 5 fois.

III.3.4 L'alkylation des cystéines libres

Etape cruciale dans toutes les approches redox se basant sur l'alkylation différentielle, le blocage des cystéines réduites doit être parfaitement maîtrisé avant la réduction des cystéines oxydées. La vérification de l'efficacité de cette étape s'effectue par un blocage des cystéines libres dans un extrait suivi de l'ajout d'un second agent spécifique des thiols et de sa détection dans le cas de présence de cystéines libres résiduelles. Deux agents alkylants utilisés couramment en protéomique, l'IAM et le NEM, ont été testés. La réaction d'alkylation est suivie de l'ajout d'un fluorophore maléimide spécifique des thiols (Dylight 550). Les réactions ont été menées sur 300 μ g d'extrait protéique de levure suspendu dans 600 μ L d'un tampon nommé tampon de lyse (6 M urée, 1X inhibiteur de protéase, 1% octyl- β -glucopyranoside, 150 mM Tris pH 8,8). Différentes concentrations finales dans le tampon sont testées pour l'agent alkylant :

- 0 ; 12,5 mM et 125 mM pour le NEM

- 0 ; 100 mM et 200 mM pour l'IAM

Suite aux réactions d'alkylation (température ambiante, dans le noir), 2 μ L (à 10 mM de concentration) de fluorophore sont ajoutés par condition selon les instructions du fournisseur pour cette quantité de protéine. Pour chaque condition, environ 10 μ g d'extrait sont chargés et séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12,5%. Les différentes conditions sont ensuite examinées en fluorescence.

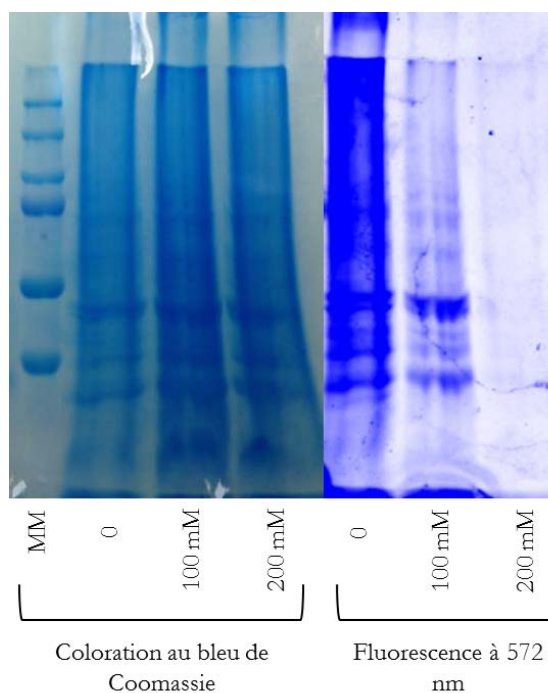


Figure 35 - Séparation SDS-PAGE d'extraits de protéomes ayant subi différentes conditions d'alkylation à l'IAM (0, 100 et 200 mM). L'image à droite représente l'observation de la fluorescence pour les trois conditions (émission à 572 nm, accumulation pendant 30 secondes). L'alkylation à 200 mM ne montre pas de fluorescence indiquant l'absence de thiols libres résiduels. L'image à gauche représente la coloration du même gel au bleu de Coomassie mettant en évidence les protéines séparées. Abréviation – MM : marqueurs de poids moléculaire.

Sur la Figure 35, la fluorescence est observée dans le cas témoin (sans agent alkylant, colonne 0) confirmant la fixation du fluorophore dans le cas de disponibilité de thiols libres. La deuxième condition montre une fluorescence résiduelle indiquant que 100 mM d'IAM n'est pas une concentration suffisante pour une alkylation totale. L'absence de fluorescence dans le cas de 200 mM d'IAM permet de valider cette condition comme étant adéquate pour bloquer les thiols libres dans l'extrait protéique.

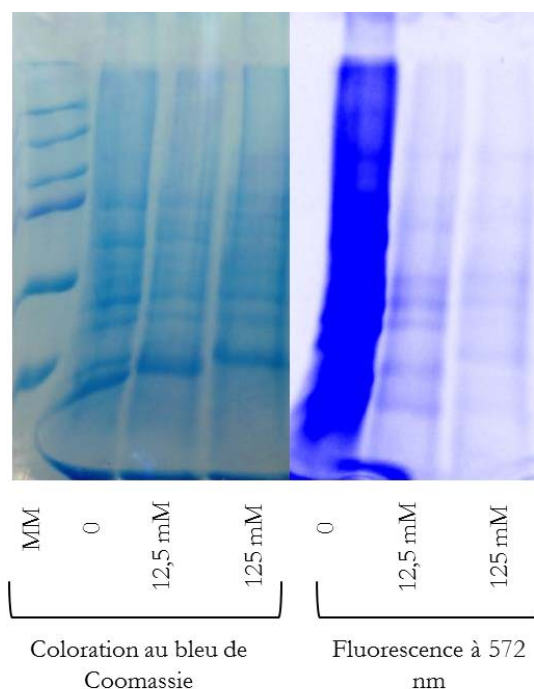


Figure 36 - Séparation SDS-PAGE d'extraits de protéomes ayant subi différentes conditions d'alkylation au NEM (0 ; 12,5 et 125 mM). L'image à droite représente l'observation de la fluorescence pour les trois conditions (émission à 572 nm, accumulation pendant 30 secondes). Une fluorescence est observée dans tous les cas, même à une concentration de 125 mM de NEM, indiquant la présence de thiols libres résiduels. L'image à gauche représente la coloration du même gel au bleu de Coomassie mettant en évidence les protéines séparées.

La Figure 36 montre de la fluorescence résiduelle à une concentration de 12,5 mM de NEM. Cette fluorescence est observée encore à une concentration de 125 mM. Il n'était pas possible de tester des concentrations plus élevées en NEM compte tenu de sa limite de solubilité.

Ainsi, une concentration de 200 mM d'IAM (600 μ L) sera appliquée à nos extraits de 300 μ g de protéines pour la suite dans notre protocole.

III.3.5 La réduction des cystéines oxydées

L'étape suivante du protocole consiste en une réduction des cystéines réversiblement oxydées. Dans le protocole complet, cette étape serait précédée d'une élimination du premier agent alkylant par précipitation au TCA.

Le DTT est un agent réducteur employé couramment en protéomique. Différentes conditions de réduction ont été testées. Une condition supplémentaire avec un autre agent réducteur, le TCEP, a été testée également pour comparaison.

Ainsi, 485 nmol (32 mg) d'albumine de sérum bovin (BSA) sont soumis à une alkylation par 171,2 μ mol (21,4 mg) de NEM. La BSA possédant 35 cystéines, ceci revient à un rapport de 10 équivalents de NEM/cystéine.

Suite à la réaction d'alkylation, les 4 conditions suivantes de réduction sont testées sur des aliquotes de 400 pmol de BSA/condition :

- 1 μ mol de DTT, 2h à 37 °C
- 1 μ mol de DTT, 30 min à 60 °C
- 1 μ mol de DTT, 10 min au micro-onde
- 0,5 μ mol de TCEP, 2h à 37 °C

Dans les 4 conditions, la réduction est suivie de l'ajout de 50 μ mol d'IAM pour alkyler les cystéines libérées. Les différentes conditions sont ensuite soumises à une digestion tryptique suivie d'une analyse en LC-MS. La recherche dans les banques de données est effectuée par le logiciel MaxQuant. Les alkylations par l'IAM et le NEM sont incluses comme modifications variables.

Dans chaque condition la somme des intensités des cystéines carbamidométhylées est normalisée par la somme des intensités des peptides sans cystéine dans l'analyse LC-MS correspondante. Les résultats sont présentés à la Figure 37.

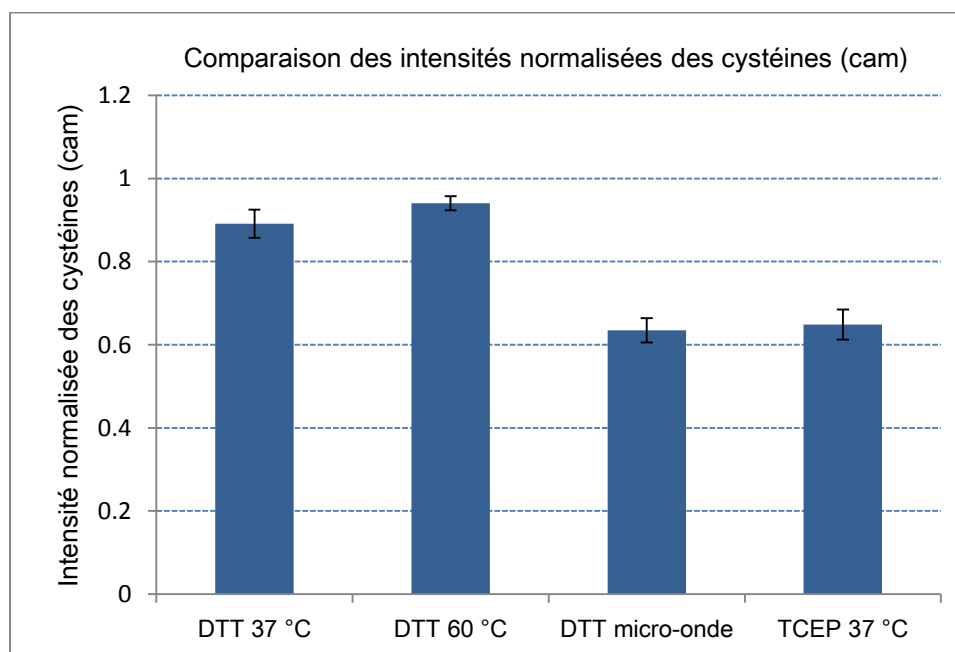


Figure 37 - Comparaison de plusieurs conditions de réduction des cystéines. Les barres représentent l'intensité totale de toutes les cystéines réduites puis alkylées (cam : carbamidométhyl) selon une des quatre conditions testées.

Ces résultats montrent des intensités presque équivalentes pour la réduction au DTT à 37 et 60 °C. Les intensités pour la réduction au micro-onde et au TCEP sont plus faibles, ceci indiquerait un rendement global de réduction moins important des cystéines oxydées. La même étude effectuée cystéine par cystéine offre une vue plus claire et permet de révéler que l'efficacité de réduction par un mode ou un autre est site dépendante comme le montrent la Figure 38 et la Figure 39.

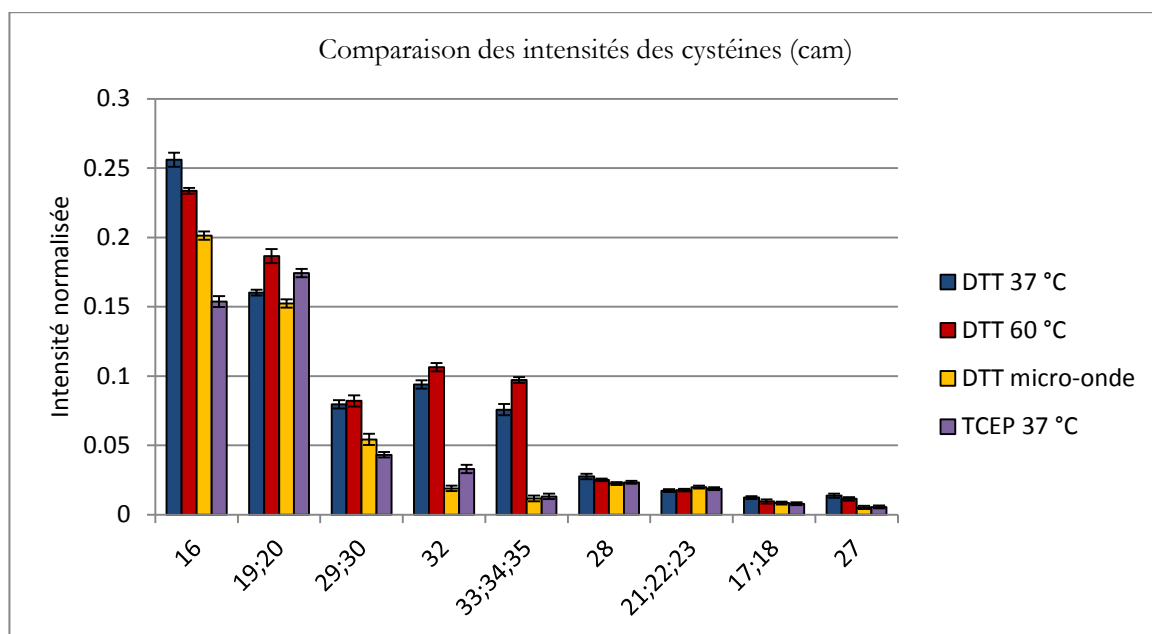


Figure 38 - Comparaison des intensités des cystéines carbamidométhylées (cam). Les chiffres indiqués dans l'axe des abscisses représentent les cystéines selon leur position dans la séquence protéique.

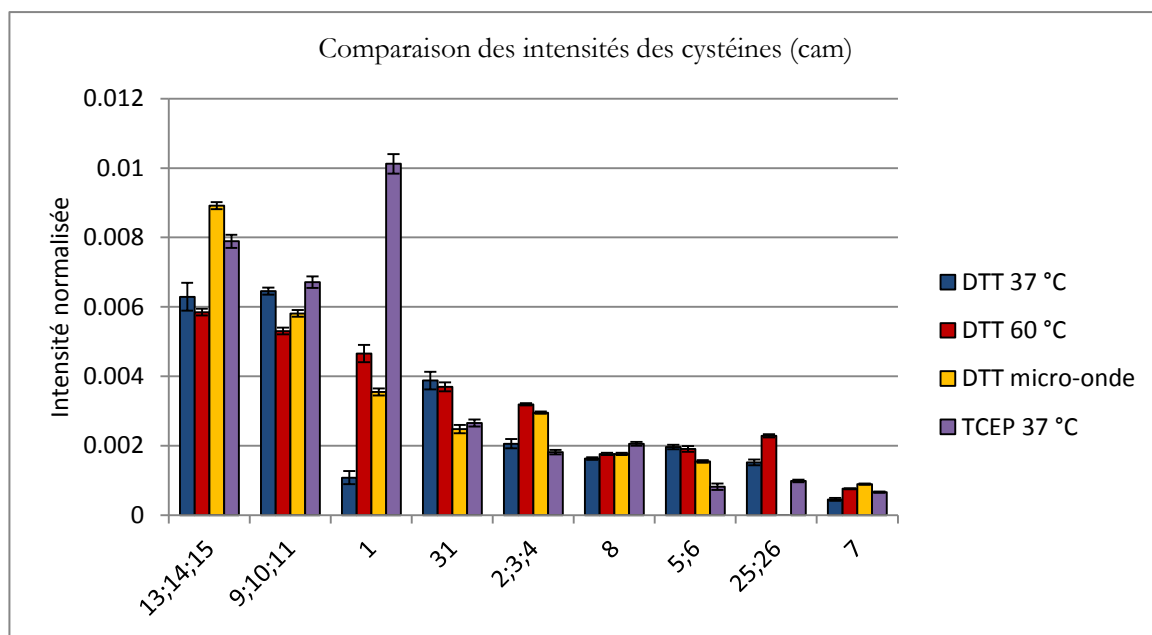


Figure 39 - Comparaison des intensités des cystéines carbamidométhylées (suite). Les cystéines représentées dans cette figure sont séparées de la figure précédente pour offrir une vue plus claire puisqu'elles possèdent des intensités plus faibles (d'un ordre de grandeur au moins).

Nous remarquons que pour 21 des 33 cystéines identifiées le DTT à 37 ou 60 °C permet une meilleure réduction des cystéines. La réduction au DTT au micro-onde permet une meilleure réduction pour 7 sites, alors que le TCEP permet une meilleure réduction de 4 cystéines. Même dans ces cas (sauf pour la première cystéine) la réduction au DTT à 37 et 60 °C permet des rendements de réduction proches. La réduction au DTT à 37 °C pendant 2h est donc retenue pour notre protocole, cette condition est une condition classique du point de vue de son utilisation en protéomique.

III.3.6 Le marquage à la biotine HPDP

Suite à l'élimination de l'excès de DTT ayant servi à la réduction des cystéines oxydées, celles-ci sont marquées par le réactif biotine HPDP. Ce marquage prépare à l'enrichissement sélectif des cystéines oxydées. Cette étape est entièrement conditionnée par la limite de solubilité de la biotine HPDP qui doit être dissoute dans un solvant organique (diméthylformamide) avant son introduction dans le tampon de lyse utilisé pour effectuer le marquage. Dans ces conditions, la biotine HPDP se trouve à une concentration finale de 0,34 mM. Pour un volume de 700 µL et une quantité d'extrait de 200 µg de protéines, la biotine HPDP est à 70 équivalents par cystéine (10

cystéines par protéine en moyenne et un poids moléculaire moyen de 60 kDa par protéine), un rapport qui dépasse le rapport de 2 équivalents de biotine/cystéine proposé par le fournisseur. En prenant en compte que la majorité des cystéines sont à l'état réduit dans le protéome et que le marquage à la biotine HPDP concerne les cystéines oxydées, l'excès de biotine HPDP est donc encore plus important.

III.3.7 L'enrichissement des cystéines oxydées

Le marquage des cystéines oxydées est suivi d'une digestion tryptique. A l'issue de cette étape, nous procédons à un enrichissement sélectif des cystéines oxydées par chromatographie d'affinité avec la streptavidine greffée sur billes d'agarose.

Etant donné que la biotine HPDP est clivable au niveau des ponts disulfure formés avec les peptides contenant une cystéine, l'élution des peptides enrichis s'effectue par réduction de la liaison -S-S- avec un agent réducteur tel le DTT. Les questions que nous nous posons à cette étape-là sont : Quelle est l'efficacité de l'enrichissement ? Quelle est l'efficacité de l'élution ?

Efficacité de l'enrichissement

Pour tester l'efficacité de cette étape, un digestat de protéome WT *vs.* Δ TRR1 traité selon la procédure OcSILAC est analysé en LC-MS. L'identification des protéines est effectuée avec le logiciel MaxQuant. La carbamidométhylation et le marquage par biotine HPDP des cystéines sont inclus en tant que modifications variables.

Dans un premier temps la fraction non enrichie est inspectée pour la présence de peptides biotinylés. La recherche révèle la présence d'une seule séquence peptidique avec une cystéine biotinylée sur 1147 séquences avec cystéine identifiées dans cette fraction avec un PEP < 0,05 (*Posterior Error Probability*, calcul statistique fournissant un indice de confiance analogue au *False Discovery Rate*). D'autre part, parmi les séquences avec cystéine identifiées dans cette fraction une seule séquence est identifiée avec une cystéine non modifiée (et donc initialement oxydée dans l'extrait et non marquée à la biotine) indiquant l'efficacité du marquage à la biotine HPDP.

La fraction enrichie est, elle, inspectée pour évaluer le taux d'enrichissement non spécifique. Nous trouvons dans cette fraction 2012 séquences peptidiques avec au moins une cystéine identifiée comme non modifiée (et donc initialement oxydée dans l'extrait, modifiée par la biotine HPDP suite à l'alkylation différentielle puis réduite par

le DTT). Le nombre total de séquences identifiées dans cette fraction est de 3021, indiquant un taux d'enrichissement non spécifique de 35% (ce chiffre comprend les séquences sans cystéine et les séquences avec des cystéines mais toutes carbamidométhylées).

Efficacité de l'élution au DTT

Suite à l'élution au DTT de la fraction enrichie de l'extrait de protéome WT *vs.* Δ TRR1, 500 μ L d'un tampon dénaturant (6M urée, 1% octyl- β -glucopyranoside, 150 mM Tris pH 8,8) sont ajoutés à la résine de streptavidine ayant servi à l'enrichissement des cystéines biotinyllées. Deux heures plus tard, les peptides résiduels élués sont collectés, dessalés sur ZipTipTM C₁₈ et analysés en LC-MS. L'identification des protéines est effectuée avec le logiciel MaxQuant. Cette deuxième élution par dénaturation permet l'identification de 81 séquences peptidiques dont uniquement deux avec cystéines modifiées par la biotine HPDP. L'élution au DTT est donc d'une efficacité très satisfaisante.

III.4 L'analyse nanoLC-MS

Dans un premier temps, il est envisagé d'analyser les échantillons soumis à la stratégie OcSILAC sans *a priori*. Ainsi, des conditions classiques utilisées pour la séparation des mélanges peptidiques complexes en nanoLC et pour leur détection en spectrométrie de masse ont été adoptées. Les principes de la nanoLC sont présentés en Annexe I page 219, alors que les conditions opératoires sont détaillées en Annexe II page 224. Les analyses sont effectuées sur un spectromètre de masse de type QqOrbitrap (Q Exactive, Thermo Scientific) (configuration de l'instrument présentée en Annexe I page 221). La détection des espèces analysées s'effectue en mode *data-dependent analysis* (DDA) adapté au criblage et l'analyse de mélanges complexes (principe de l'analyse DDA détaillé en Annexe I page 222). Les paramètres de la méthode employée en spectrométrie de masse sont détaillés en Annexe II page 224.

III.5 Traitement des données générées par OcSILAC

La recherche des spectres acquis dans les banques de données et la quantification des peptides identifiés ont été effectuées avec le logiciel MaxQuant, logiciel bio-informatique développé par Cox et al. [167] et initialement conçu pour traiter et générer des données quantitatives pour des marquages SILAC. MaxQuant utilise des règles précises pour la reconstruction des pics en 2D (selon les valeurs de m/z et des intensités

relatives) puis en 3D en rajoutant la grandeur du temps d'élution. Cette reconstruction permet une recalibration des valeurs m/z des pics, résultant en une précision en masse de l'ordre du ppb. Ce haut degré de précision permet l'identification du profil isotopique et en suite la recherche du partenaire (lourd ou léger) qui respecte les règles (différence de masse, corrélation des intensités dans le temps, état de charge et corrélation entre les ions les plus intenses dans les profils isotopiques) avant même l'identification de la séquence peptidique.

Cependant les données générées par MaxQuant nécessitent un retraitement supplémentaire afin de prendre un compte les spécificités de notre protocole de quantification des modifications sur les résidus cystéines.

III.5.1 Préparation des données

Dans un premier temps les données sont préparées pour leur retraitement par une macro développée en Visual Basic. Cette étape consiste en un tri des séquences peptidiques identifiées pour conserver uniquement celles qui sont repérées dans au moins deux répliques analytiques et les séparer ensuite en 2 groupes : i) séquences qui contiennent des cystéines et ii) séquences sans cystéine. Les séquences contenant une cystéine possèdent un filtre supplémentaire pour éliminer celles identifiées avec un PEP > 0,05. Les séquences contenant des cystéines sont à leur tour séparées en 3 groupes : i) séquences contenant une cystéine oxydée (ou plusieurs cystéines entièrement oxydées), ii) séquences contenant une cystéine réduite (ou plusieurs cystéines entièrement réduites) et iii) séquences contenant deux cystéines ou plus dans deux états redox différents.

III.5.2 Estimation des rapports de niveaux d'expression des protéines et des rapports des cystéines oxydées et réduites.

Afin d'évaluer le rapport d'une cystéine dans un état redox donné entre la souche WT et la souche Δ TRR1, la moyenne des rapports H/L est calculée :

- Moyenne des rapports H/L obtenus pour une cystéine oxydée (ou plusieurs cystéines toutes oxydées) : r_{ox}
- Moyenne des rapports H/L obtenus pour une cystéine réduite (ou plusieurs cystéines toutes réduites) : r_{re}
- Moyenne des rapports H/L obtenus pour un peptide contenant deux cystéines ou plus dans deux états redox différents (mixte) : r_{mi}

Quant au profil d'expression r , il est estimé en moyennant les rapports H/L de tous les peptides sans cystéine et uniques à la protéine en question.

Afin d'effectuer ces calculs et d'autres opérations statistiques, nous avons eu la chance de collaborer avec Isabelle Rivals de l'Equipe de Statistique Appliquée de l'ESPCI pour développer un algorithme en Matlab. Grâce à ce logiciel « maison » nous pouvons générer les rapports mentionnés ci-dessus, mais également éliminer les données aberrantes afin de fournir des données quantitatives plus fiables.

III.5.3 Estimation des pourcentages des formes oxydée et réduite dans chacune des souches étudiées

Vu que les expériences impliquant un marquage métabolique sont comparatives, les données quantitatives générées sont de nature relative. Il est cependant possible dans certains cas d'avoir accès aux données propres à chacune des souches étudiées telles que les pourcentages de la forme oxydée et de la forme réduite d'une cystéine dans une des deux souches.

Posons pour i (où $i = WT$ ou $\Delta TRR1$):

- n_{ox}^i : nombre de moles d'une cystéine sous forme oxydée dans l'échantillon i
- n_{re}^i : nombre de moles d'une cystéine sous forme réduite dans l'échantillon i
- $n^i = n_{ox}^i + n_{re}^i$: nombre de moles total d'une cystéine dans l'échantillon i
- p_{ox}^i : pourcentage de la forme oxydée d'une cystéine dans l'échantillon i
- p_{re}^i : pourcentage de la forme réduite d'une cystéine dans l'échantillon i

Nous disposons donc des estimations de :

- $r_{ox} = n_{ox}^{WT} / n_{ox}^{\Delta TRR1}$
- $r_{re} = n_{re}^{WT} / n_{re}^{\Delta TRR1}$
- $r = n^{WT} / n^{\Delta TRR1}$

Nous cherchons à estimer :

- $p_{ox}^{WT} = n_{ox}^{WT} / n^{WT}$
- $p_{ox}^{\Delta TRR1} = n_{ox}^{\Delta TRR1} / n^{\Delta TRR1}$

Nous pouvons donc bien sûr déduire $p_{re}^{WT} = n_{re}^{WT} / n^{WT} = 1 - p_{ox}^{WT}$ et

$$p_{re}^{\Delta TRR1} = n_{re}^{\Delta TRR1} / n^{\Delta TRR1} = 1 - p_{ox}^{\Delta TRR1}$$

Il en suit que les pourcentages des formes oxydées peuvent être exprimées en fonction des grandeurs connues selon :

$$\boxed{p^{JTRR/}_{ox} = \frac{r - r_{re}}{r_{ox} - r_{re}}} \quad \text{et} \quad \boxed{p^{WT}_{ox} = \frac{1/r - 1/r_{re}}{1/r_{ox} - 1/r_{re}}}$$

Il est donc possible d'estimer les pourcentages recherchés pour une cystéine dans une des deux souches mais sous condition d'avoir l'information totale des rapports des formes réduite et oxydée ainsi que l'information du profil d'expression de la protéine parent.

Ces équations nous permettent également d'établir des règles que les grandeurs mesurées devraient suivre. Les quantités recherchées étant des rapports, leurs valeurs sont comprises entre 0 et 1. Par exemple, le fait que $p^{JTRR/}_{ox} \geq 0$ implique que, pour le profil d'expression r :

- soit $r \geq r_{re}$ et $r_{ox} \geq r_{re}$
- soit $r \leq r_{re}$ et $r_{ox} \leq r_{re}$

Le fait que $p^{JTRR/}_{ox} \leq 1$ implique dans le premier cas que $r \leq r_{ox}$ et l'inverse dans le second. Les rapports respectent donc :

$$\boxed{r_{ox} \leq r \leq r_{re}} \quad \text{ou} \quad \boxed{r_{re} \leq r \leq r_{ox}}$$

Ces deux conditions peuvent être exprimées selon : $(r_{ox} - r) \times (r_{re} - r) \leq 0$. Notons que l'on retrouve la contrainte que si $r_{ox} = r_{re}$, alors nécessairement $r = r_{ox} = r_{re}$. Dans ce cas il est impossible d'estimer les fractions oxydées et réduites. Notons également que les valeurs p^{WT}_{ox} et $p^{JTRR/}_{ox}$ sont des grandeurs obtenues indirectement des données acquises par spectrométrie de masse. Il en suit que l'incertitude sur ces valeurs peut être importantes, compte tenu de la propagation d'erreur et ce d'autant plus lorsque $r \rightarrow r_{re}$ ou $r \rightarrow r_{ox}$. Ces estimations restent une bonne indication des fractions oxydées et réduites.

A partir des équations obtenues ci-dessus, nous pouvons également en tirer des tendances générales du comportement de p^{WT}_{ox} et $p^{JTRR/}_{ox}$ en fonction des valeurs de r_{ox} , r et r_{re} . Pour cela, des tests statistiques (Wilcoxon, Student ou Welch) sont effectués par l'algorithme Matlab pour tester les hypothèses où : $r \approx r_{re}$ ou $r \approx r_{ox}$. Nous pourrions ainsi distinguer 5 cas de figure résumés ainsi :

1. $r \neq r_{re}$ et $r \neq r_{ox}$ et $(r_{ox} - r) \times (r_{re} - r) < 0$: les estimations de p^{WT}_{ox} et $p^{JTRR/}_{ox}$ sont fournies.

2. $r = r_{ox}$ et $r \neq r_{re} : p_{ox}^{WT} \approx p_{ox}^{I^{TRR1}} \approx 100\%$, la fraction oxydée est majoritaire avec peu de changement entre les deux conditions.
3. $r = r_{re}$ et $r \neq r_{ox} : p_{ox}^{WT} \approx p_{ox}^{I^{TRR1}} \approx 0\%$, la fraction réduite est majoritaire avec peu de changement entre les deux conditions.
4. $r \approx r_{re}$ et $r \approx r_{ox}$: une estimation précise des pourcentages n'est pas possible.
5. $r \neq r_{re}$ et $r \neq r_{ox}$ mais $(r_{ox} - r) \times (r_{re} - r) > 0$, les valeurs calculées sont *a priori* aberrantes puisque les conditions établies ne sont pas respectées. Ceci indiquerait que l'hypothèse de départ selon laquelle $n^i = n_{ox}^i + n_{re}^i$ n'est pas vraie. Une contribution supplémentaire à n^i existe et n'est pas prise en compte. Ceci pourrait provenir d'une modification sur un autre acide aminé dans la séquence étudiée ou sur la cystéine dans le cas d'une oxydation irréversible qui n'est pas prise en compte par exemple.

III.6 Pour aller plus loin, le fractionnement subcellulaire

Afin de comprendre et, éventuellement, prédire les effets du changement de l'exposome, notamment le changement des conditions redox, il est essentiel de pouvoir déchiffrer le redoxome des cellules et de déterminer les protéines dont l'activité est gouvernée par l'état d'oxydation de leurs cystéines. L'importance de ce type d'étude est illustrée par le développement d'un grand nombre de stratégies analytiques décrivant les PTMs des cystéines. Nous avons vu en §III.3 le développement de la stratégie OcSILAC sur un modèle de levure. L'exploitation des données générées permet d'obtenir une vue globale des changements de l'état redox d'un résidu cystéine et de les corrélérer à l'information du niveau d'expression de la protéine.

La majorité des méthodes en protéomique redox étant basée sur une caractérisation du redoxome par analyse LC-MS, ces méthodes restent intrinsèquement limitées par la gamme dynamique accessible en spectrométrie de masse. Cette limitation est très importante pour les problématiques redox car la distribution des concentrations des résidus cystéines dans les différents états d'oxydation s'étend sur plusieurs ordres de grandeur. L'enrichissement d'une fraction spécifique (cystéines nitrosylées, cystéines réversiblement oxydées en général, etc.) a été évoqué dans ce manuscrit et l'enrichissement suite à un marquage à la biotine fait partie intégrante de la stratégie OcSILAC. Parmi les autres recours possibles, citons le préfractionnement en milieu liquide des peptides selon leur point isoélectrique (électrophorèse OFFGEL [168]) et la chromatographie liquide en 2D (2D-LC).

Dans ce cadre, le fractionnement subcellulaire se présente comme une stratégie qui possède un intérêt supplémentaire. En effet, les méthodes quantitatives employées en protéomique en général permettent de générer des résultats quantitatifs moyennés sur l'ensemble de la cellule. Ces données ne prennent donc pas en compte les variations du niveau d'expression au niveau subcellulaire. Ceci s'applique également sur les données quantitatives générées en protéomique redox. Nous avons vu l'exemple de l'oxydation des cystéines de la protéine Keap1 qui est accompagnée d'une translocation du facteur de transcription Nrf2 au noyau dans la partie §I.4.2.1. Ainsi le fractionnement cellulaire permettrait non seulement d'augmenter la couverture du redoxome, mais également de fournir des données plus fines. A notre connaissance, aucune méthode intégrant un fractionnement subcellulaire n'est proposée actuellement en protéomique redox.

Parmi les kits disponibles commercialement, nous avons retenu un kit qui permet d'obtenir des fractions correspondant aux protéines cytoplasmiques, protéines membranaires, protéines nucléaires solubles et protéines liées à la chromatine. Le principe du fractionnement se base sur l'utilisation de différents tampons permettant d'extraire successivement des fractions différentes correspondant à des compartiments différents. Le premier tampon *Cytoplasmic Extraction Buffer* (CEB) extrait les protéines cytoplasmiques. Le deuxième tampon *Membrane Extraction Buffer* (MEB) dissout les membranes des mitochondries, réticulum endoplasmique et corps de Golgi mais pas l'enveloppe nucléaire. Le troisième tampon *Nuclear Extraction Buffer 1* (NEB1) permet la récupération de la fraction soluble des protéines nucléaires, alors que le tampon NEB2 (tampon NEB 1 + nucléase micrococcale, enzyme catalysant l'hydrolyse de l'ADN) permet de libérer les protéines liées à la chromatine.

Plusieurs questions se posent : le blocage des cystéines libres par alkylation à l'IAM est-il efficace dans les tampons du kit ? L'extraction des protéines dans ces tampons produit-elle des oxydations artéfactuelles ? Et finalement, le fractionnement subcellulaire adapté à la stratégie OcSILAC conserve-t-il son efficacité ?

Le kit étant commercialisé pour les cultures de cellules de mammifères, les différentes étapes d'optimisation ont été effectuées sur des cellules HeLa.

III.6.1 Vérification du blocage des cystéines libres

Dans un premier temps, le protocole a été suivi selon les instructions du fournisseur. 10⁶ cellules HeLa sont suspendues dans 100 µL de tampon CEB auquel a été

ajouté de l'IAM à différentes concentrations finales à tester : 100, 200 et 300 mM. La fraction soluble dans le tampon CEB est retirée et le culot est resuspendu dans 100 μ L de tampon MEB complété par les mêmes concentrations en IAM à tester. La même opération est effectuée avec les tampons NEB1 et NEB2. A chaque fois qu'une fraction est retirée, la réaction d'alkylation à l'IAM est poursuivie dans le noir. A l'issue de cette étape, un fluorophore maléïmide marquant les cystéines libres est ajouté. Les protéines sont ensuite séparées par sur gel comme ceci a été décrit dans la partie §III.3.4. Les gels sont observés en fluorescence (Figure 40).

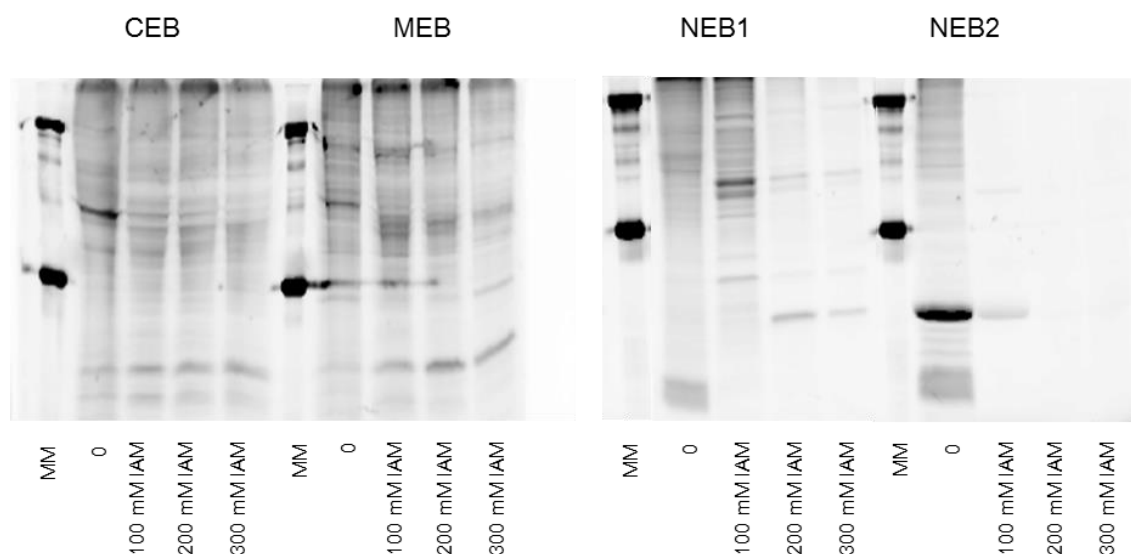


Figure 40 - Séparation SDS-PAGE des différentes fractions subcellulaires ayant subi différentes conditions d'alkylation à l'IAM (0, 100 mM, 200 mM et 300 mM). Les images représentent l'observation de la fluorescence pour les quatre conditions testées sur les fractions CEB, MEB, NEB1 et NEB2 (émission à 572 nm, accumulation pendant 30 secondes). Une fluorescence est observée dans la majorité des cas, indiquant une alkylation incomplète des thiols libres. L'alkylation était efficace dans le seul cas de la fraction NEB2 pour des concentrations d'IAM de 200 mM et 300 mM.

L'observation des différentes conditions d'alkylation révèle la présence de fluorescence dans la majorité des cas. Seule l'alkylation dans le tampon NEB2 à 200 mM et 300 mM d'IAM ne révèle pas de fluorescence. Les tampons fournis avec le kit ne permettent pas d'obtenir un blocage satisfaisant des cystéines libres.

Un test du pH de ces différents tampons montre qu'ils possèdent des pH < 7, il a été donc décidé d'augmenter le pH à ~8 avec du tampon Tris 150 mM. Les tests d'alkylation sont répétés dans ces nouvelles conditions. Les protéines alkylées puis

marquées au fluorophore maléimide sont séparées sur gel et observées en fluorescence (Figure 41).

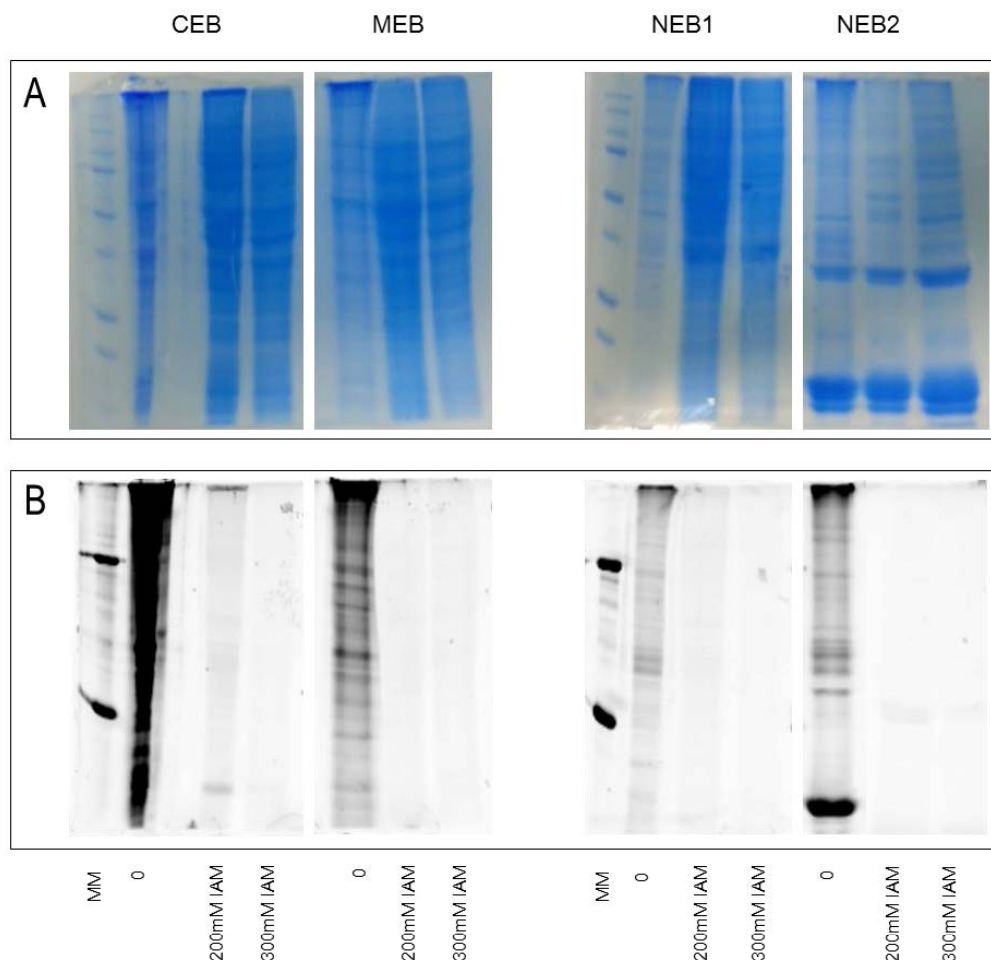


Figure 41 - Séparation SDS-PAGE des différentes fractions subcellulaires ayant subi différentes conditions d'alkylation à l'IAM (0, 100 mM, 200 mM et 300 mM) selon le protocole de fractionnement modifié (pH 8). (A) Coloration des gels au bleu de Coomassie mettant en évidence les protéines séparées. (B) Les images représentent l'observation de la fluorescence pour les quatre conditions d'alkylation testées sur les fractions CEB, MEB, NEB1 et NEB2 (émission à 572 nm, accumulation pendant 30 secondes). L'alkylation à 300 mM d'IAM ne montre pas de fluorescence résiduelle indiquant un blocage efficace des thiols libres.

La révélation des gels à la fluorescence montre qu'à une concentration de 300 mM d'IAM la fluorescence n'est plus observée. Cette condition est donc adoptée dans notre protocole.

III.6.2 Etude de la possibilité d'oxydations non spécifiques dues au protocole modifié

Afin de vérifier la possibilité que le protocole de fractionnement subcellulaire induise un changement de l'état d'oxydation des cystéines, deux cultures de cellules HeLa sont réalisées dans un milieu SILAC lourd et un milieu léger. 10^6 cellules HeLa cultivées en milieu lourd subissent la précipitation au TCA 20% selon le protocole classique, suivie d'une alkylation à l'IAM, alors qu'une quantité équivalente de cellules cultivées en milieu léger est soumise au protocole de fractionnement avec alkylation à l'IAM. Les différentes fractions (CEB, MEB, NEB1 et NEB2) issues du fractionnement de la culture légère sont ensuite réunies et l'IAM en excès est éliminé par précipitation au TCA. Les deux conditions sont resuspendues dans le tampon de lyse classique et réunies en poursuivant le protocole OcSILAC classique (réduction des cystéines libres, marquage à la biotine, etc.). L'analyse des échantillons est effectuée en LC-MS et les données sont soumises à une recherche bio-informatique par le logiciel MaxQuant.

Les ratios H/L obtenus pour les cystéines oxydées et réduites par analyse LC-MS sont corrigés (normalisés) par les profils d'expression (ratio H/L) de la protéine correspondante. Les ratios ainsi obtenus sont ensuite passés en log2 et les distributions des deux populations de cystéines (réduites et oxydées) sont représentées (Figure 42).

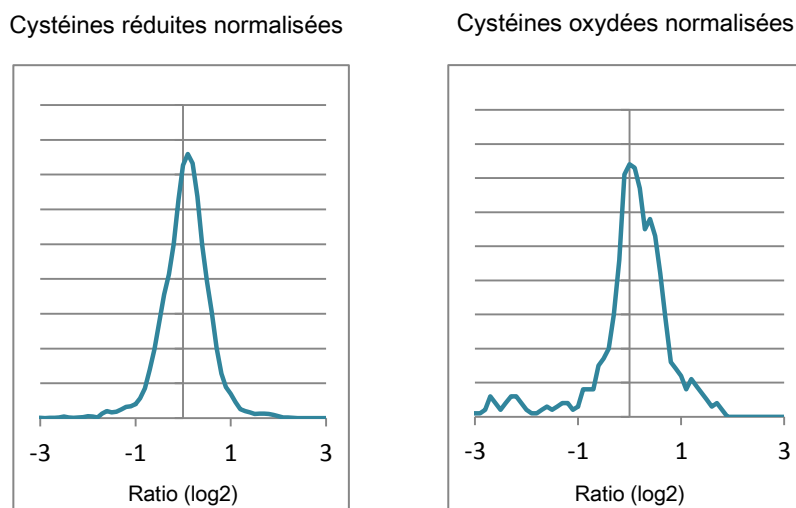


Figure 42 - représentation de la distribution des ratios r_{ox} et r_r corrigés par le niveau d'expression de la protéine.

La distribution des deux populations est centrée au tour de zéro, confirmant ainsi que l'oxydation non spécifique due au fractionnement subcellulaire reste non détectable.

III.6.3 Contrôle de l'efficacité du fractionnement subcellulaire

L'efficacité du protocole de fractionnement adapté à notre stratégie redox a été enfin comparée au protocole classique du fournisseur selon les critères de validation fournis avec le kit. Selon ces critères, un nombre de protéines représentatives des compartiments subcellulaires fractionnés sont suivies dans les différentes fractions obtenues. Ainsi, 10^6 cellules HeLa cultivées dans un milieu lourd sont soumises au protocole de fractionnement classique, alors que la même quantité de cellules cultivées dans un milieu léger subit le protocole adapté à notre stratégie redox. A l'issue de chaque étape de fractionnement, les deux fractions provenant des deux conditions lourde et légère sont réunies, digérées et analysées en LC-MS. Les données quantitatives obtenues par l'analyse sont comparées aux résultats des *Western Blot* fournis avec le kit (Figure 43).

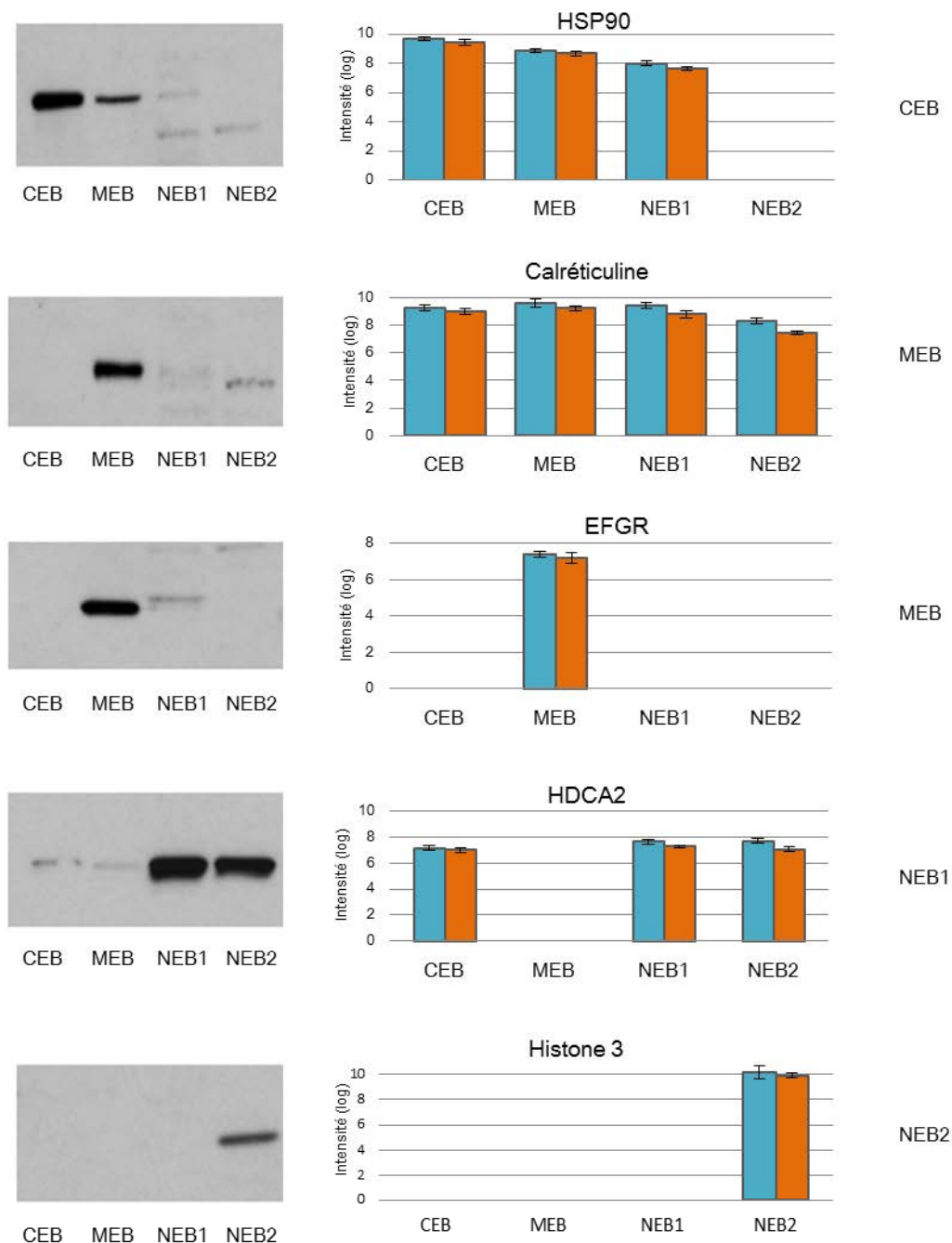


Figure 43 - Comparaison de l'efficacité de fractionnement selon le protocole du fournisseur et selon le protocole adapté à la stratégie OcSILAC. A gauche, les images *Western Blot* fournies avec le kit montrant les bandes obtenues pour 5 protéines différentes dans les fractions où elles sont attendues. A droite, la somme des intensités des pics obtenus pour les mêmes protéines dans les différentes fractions, selon les deux protocoles comparés. En **bleu**, le protocole du fournisseur et en **orange** notre protocole modifié. Abréviations - CEB : *Cytoplasmic Extraction Buffer*, MEB : *Membrane Extraction Buffer*, NEB1 : *Nuclear Extraction Buffer 1*, NEB 2 : *Nuclear Extraction Buffer 2*.

Les résultats de l'analyse LC-MS permettent de noter une bonne corrélation entre la distribution des protéines dans les différentes fractions selon les images de *Western Blot*

fournies avec le kit et la distribution des protéines de l'extrait traité selon les deux protocoles que nous comparons. Dans le cas de la calréticuline, la protéine est observée dans toutes les fractions, nous n'obtenons pas l'efficacité de fractionnement suggérée par le manuel du fournisseur. Le même phénomène est observé pour la protéine HDCA2 détectée dans la fraction CEB. Cependant ceci est vrai pour les deux protocoles testés. D'une manière plus importante, nous observons une excellente corrélation des intensités obtenues avec les deux protocoles. Les modifications apportées pour adapter le protocole de fractionnement à la stratégie OcSILAC ne mènent pas à une perte de l'efficacité de séparation.

III.7 Conclusion

Dans cette première partie du projet, nous avons pu mettre en place tout le protocole expérimental de la stratégie OcSILAC. Les étapes clés ont été vérifiées, et une attention particulière a été attribuée aux étapes critiques et à la préservation des états redox que nous souhaitons mesurer. Ceci est primordial pour la génération de données redox quantitatives fiables. Le développement de la méthode s'étendait à l'étape de traitement des résultats obtenus par la recherche bio-informatique. Un algorithme Matlab a été développé en collaboration avec l'Equipe de Statistique Appliquée vu le manque d'outils adaptés pour le traitement des données générées par OcSILAC.

Dans un deuxième temps, la stratégie OcSILAC a été adaptée pour inclure une étape de fractionnement subcellulaire. Le but est d'étendre la couverture du protéome en général et du redoxome de la cystéine en particulier. Les modifications apportées ont été testées pour vérifier la préservation des états redox, de l'efficacité du fractionnement, etc. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une stratégie analytique redox est adaptée au fractionnement subcellulaire.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons deux applications de la stratégie OcSILAC et de sa version adaptée au fractionnement subcellulaire: la première est celle évoquée dans ce chapitre, le cas du mutant Δ TRR1, présentée sous forme d'un article en cours de soumission, la deuxième application s'inscrit dans le cadre d'une étude du cancer anaplasique de la thyroïde.

Chapitre IV : OcSILAC - Résultats et Discussions

Organisation du chapitre

Suite à la mise au point de la stratégie OcSILAC et de son adaptation au kit de fractionnement subcellulaire, deux premières études ont été réalisées avec les protocoles développés. La première étude concerne le modèle de levure n'exprimant pas la thiorédoxine réductase. Ce modèle est soumis au protocole OcSILAC classique et comparé à une souche sauvage. Cette application est détaillée dans un article en cours de soumission pour publication. L'article sera présenté dans ce chapitre et suivi d'une discussion. Dans la deuxième partie du chapitre, le protocole OcSILAC adapté au fractionnement subcellulaire est employé dans le cadre d'une étude du cancer anaplasique de la thyroïde et d'un traitement en cours de développement.

IV.1 Application du protocole OcSILAC au modèle de levure Δ TRR1

IV.1.1 Article en cours de soumission

Quantitative Proteomics Analysis of Reversible Thiol Oxidation by Biotin Switch and Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture: OcSILAC, Revisiting the Post-Translational Modification Quantification Paradigm.

Shakir Shakir^{1}, Giovanni Chiappetta^{1*}, Isabelle Rivals², Iman Haddad¹, Alise Ponsero³, Michel Toledano³ and Joelle Vinb¹*

*Authors equally contributed to the Manuscript

1 ESPCI ParisTech, Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique (SMBP), USR3149 CNRS, Paris, France.

2 ESPCI ParisTech, Equipe de Statistique Appliquée, Paris, France

3 Laboratoire Stress Oxydant et Cancer, Service de Biologie Intégrative et de Génétique Moléculaire, Institut de Biologie et de Technologie de Saclay, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Gif Sur Yvette, France

Introduction

Cell biological functions are regulated through a variety of mechanisms ranging from gene expression to post-translational modifications (PTMs) on proteins. The latter have been shown to be an efficient and rapid way to confer structure and thus functionality but also to mediate cellular response to various stimuli. Mass spectrometry (MS) has been widely used as an approach to characterize and quantify PTMs. Even though MS is not inherently quantitative, a number of quantitative methods based on isotopic labeling have been developed to overcome this problem. These methods have given access to the possibility of comparing the amount of a modified peptide over a range of conditions in a single analysis. However this information is not sufficient to specifically describe the variation of a given PTM among others, since the real values result indeed from the combination of the variations of (1) the PTM of interest, (2) the protein expression level and (3) all other potential PTMs occurring on this sequence. Regardless of the nature and the site of the studied modification, several questions relevant to the biology of the system need to be asked: i) Has the amount of the modified residue changed? ii) Has the proportion of the modified residue (site occupancy) relative to the protein amount changed? iii) Could other modifications coexist on the studied peptide and generate a false positive/negative quantification? While most proteomic methods applied to PTMs are focused on answering the first question, some studies address the second question [1], whereas the last one still remains evaded. In most cases, quantitative estimations are based on the postulate that the peptide carrying the PTM of interest exists in one chemical form only or, in case of multiple modifications, the ratios are independent from each other's (a cysteine (Cys) containing peptide with and without a phosphorylated serine, should bare the same Cys redox fractions on both phosphorylated and non-phosphorylated forms). Reversible Cys oxidation is characterized by high site occupancy, ubiquitary nature, and multiple oxidation states. Its quantification constitutes a case study to develop a new strategy for PTMs quantification.

Cys oxidation to disulfide (-S-S-), sulfenic acid (-SOH-) and S-nitroso (-SNO-) residues are reversible post-translational modifications involved in many cellular functions, such as protein tertiary structure, catalytic activity and signalling. The characterization of the Cys redox state at the proteomic scale is a key step for the understanding of the thiol-redox based molecular mechanisms. This has been addressed using bidimensional electrophoresis (2DE) or various shotgun strategies (OxICAT [2] and other ICAT based protocols [3] [4], cysTMT-iodoTMT [5] [6]). As an example, OxICAT strategy [2], one of the most common tools for redoxomics, calculates the oxidized over reduced Cys ratio for each identified

cysteine to evaluate the percentage of the oxidized cysteine in one given sample. However, none of the above shotgun strategies provides both the information of expression level and redox state of proteins in a single labeling step. Moreover, one major issue of the analysis of Cys oxidation, in relation to the limited dynamic range in MS, is the high percentage of reduced cysteines in the cytoplasm and nucleus fractions [7] that could constitute 64% of the proteome [8]. In such a case, the enrichment of Cys containing peptides regardless of their redox state does not help for the detection of the oxidized species.

Here we describe an alternative strategy, called OcSILAC, which addresses most of the previously mentioned technical limitations. Technically, the Cys labeling of two samples is performed in the same tube, minimizing the effects of biased material loss or selective air mediated oxidation. We applied the OcSILAC approach to a thioredoxin reductase-1 (TRR1) knockout yeast model ($\Delta TRR1$), a common model for yeast redox studies. TRR1 is a NADH dependent reductase playing a key role in the Thioredoxin (TRX) pathway, the main cytosolic redox control. TRR1 reactivates oxidized TRX after each catalytic cycle. TRX is the exclusive reductase of peroxiredoxins, ribonucleotide reductase and 3'-phospho-5'-adenyl sulfate (PAPS) reductase [9]. Yeast cells have to face different challenges in the absence of TRR1. The limited capacity to regenerate reduced TRXs not only reduces the ability to detoxify reactive oxygen species (ROS), but also to maintain many active cellular functions. Our work focuses particularly on the development of a new way to view and interpret PTMs data.

Results

Experimental design

The major issue of the analysis of Cys oxidation at a proteomic scale is the high percentage of free Cys detectable by classical protein extraction protocols. Here we introduce the strategy OcSILAC that combines a SILAC protocol and biotin-HPDP labeling in order to simultaneously evaluate Cys redox status in cell cultures and to generate relative protein expression profiles. Several reports have demonstrated that Cys labeling with Biotin-HPDP is an efficient and selective tool to improve the analysis of oxidized proteins [10]. SILAC is a well-established strategy to obtain relative quantification of proteolytic peptides after differential metabolic labeling [11].

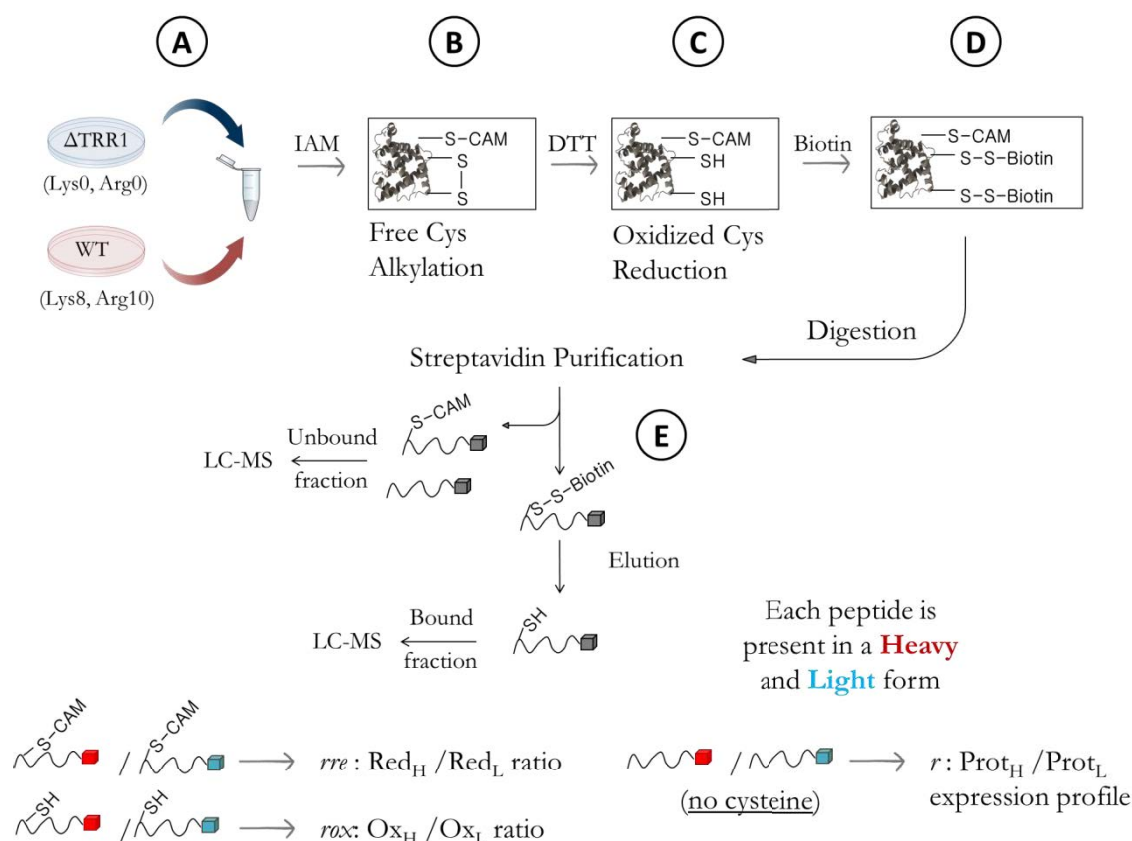


Figure 1 - OcSILAC strategy

The developed workflow is described in Figure 1. Equal quantities of test cells grown in normal medium ($\Delta TRR1$, Light sample) and control cells grown in ^{13}C and ^{15}N arginine/lysine medium (wild type (WT), Heavy sample) are pooled and acidified with TCA (step A). TCA pellets are suspended in denaturing buffer containing iodoacetamide (IAM) to alkylate free thiols to saturation (step B). After IAM removal, reversibly oxidized thiols are reduced by DTT (step C). After DTT removal, new thiols are biotinylated (step D). Trypsin digests are loaded on a streptavidin column (step E). The biotinylated fraction is then eluted by biotin-tag cleavage. Two distinct LC-MS/MS analyses of the streptavidin-bound fraction (peptides with oxidized Cys) and unbound fraction (peptides without oxidized Cys) are performed. MS quantification of the unbound fraction gives the relative protein expression levels of Heavy *vs.* Light samples. MS quantification of the bound fraction gives the extent of Cys oxidation of Heavy *vs.* Light samples.

Protein expression profiles could be used to normalize the ratios of the Cys containing peptides. Data processing is divided into three sections (Figure 2, for details see supplementary note 1). A first routine (green section) comprises data formatting and extraction into txt files from the search engine MaxQuant. The second section (blue section) gathers steps for filtering and sorting of data (visual basic routine). The third section (red section) gathers the calculation of the following ratios: (1) protein expression levels (r) after exclusion of Cys containing peptides, (2) oxidized Cys (r_{ox}) (3) reduced Cys (r_{re}), to estimate the percentages of the oxidized fraction (p_{ox}^1 and p_{ox}^2). Moreover the algorithm performs statistical tests to compare the values of ratios in order to emit a decision concerning the redox event: reduction, oxidation, existence of parallel equilibriums (Matlab routine).

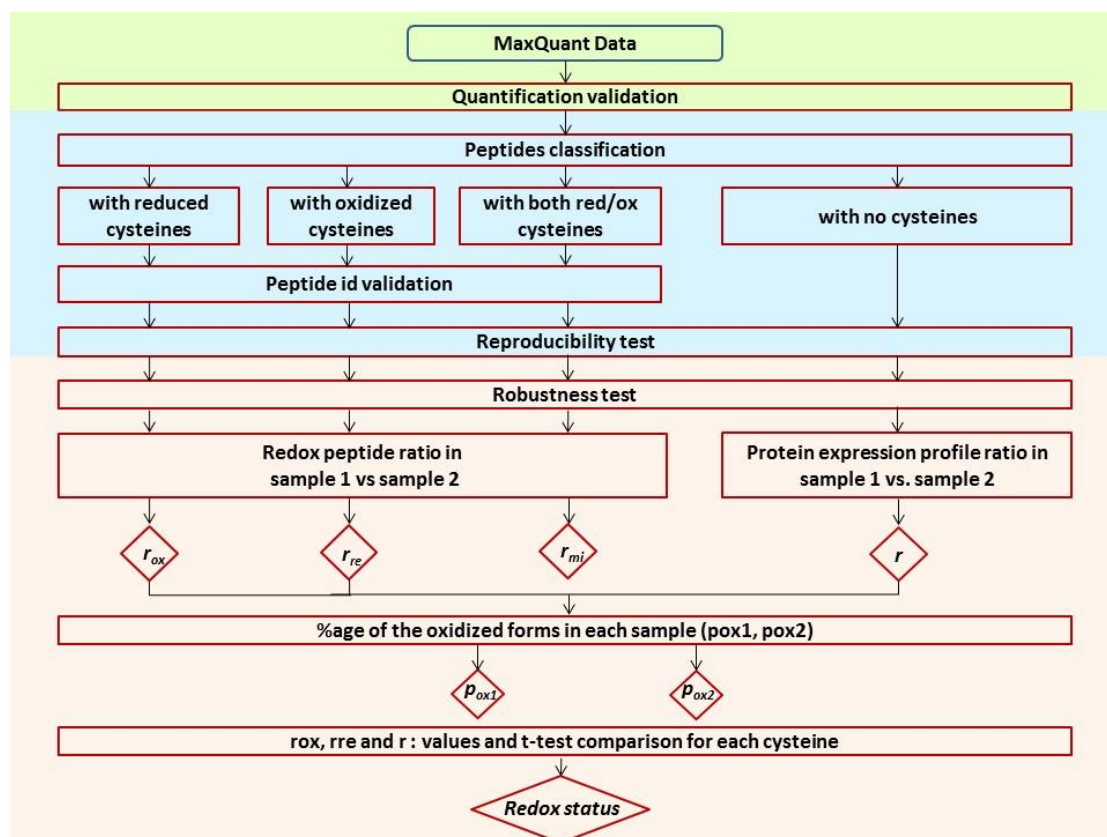


Figure 2 - Data processing workflow.

Identification of oxidized cysteines

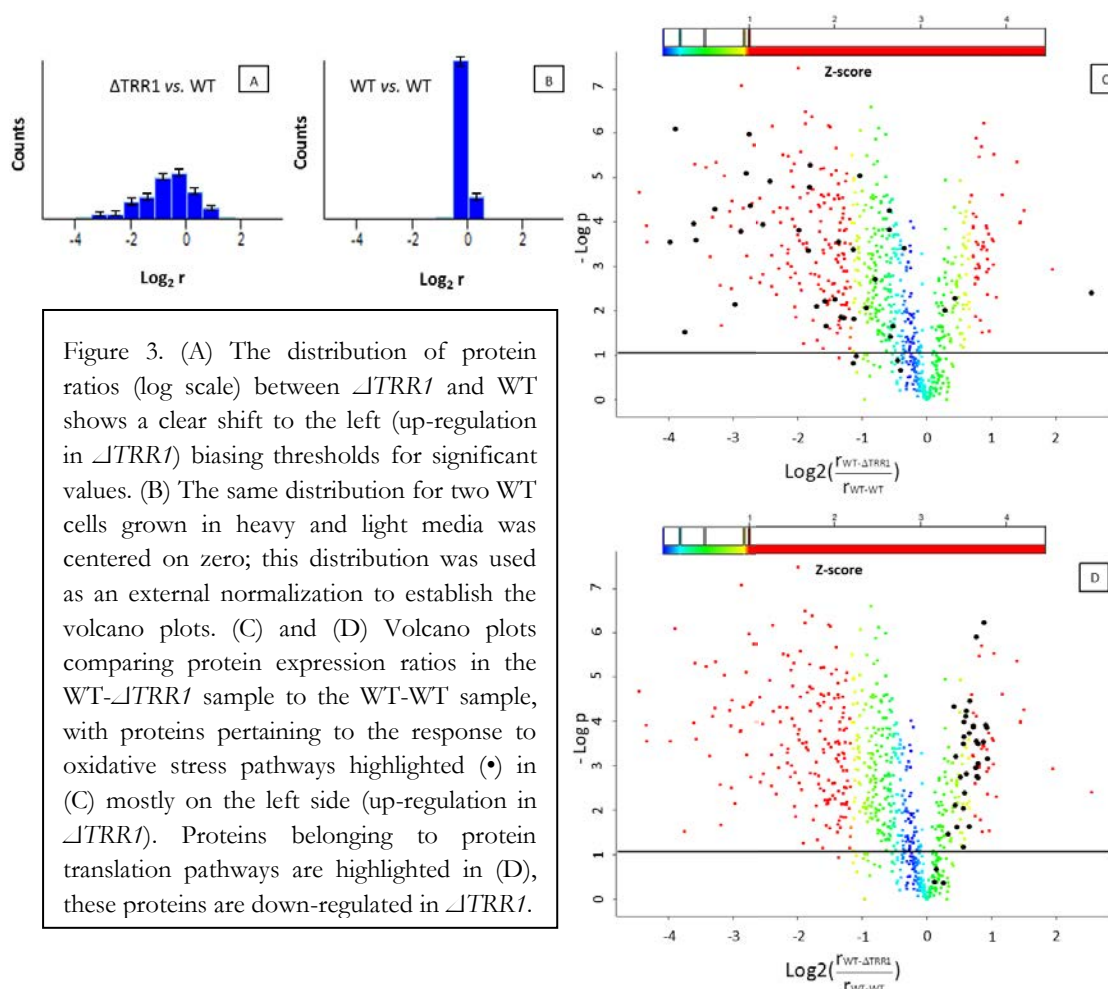
In the biotin-HPDP fraction, only Cys containing peptides that were originally oxidized are expected. Peptides are validated only if found at least in two technical replicates with a MaxQuant Posterior Error Probabilities (PEP) value < 0.05 . Unspecific retention is not negligible: carbamidomethylated peptides or peptides without Cys represent 35% of the total number of identified peptides (data not shown). 1600 oxidized Cys residues (1300 peptides) in over 850 different proteins are identified in at least two of the three biological replicates and are present in both control and Δ TRR1 yeast cells (Supplementary Table 1).

Protein expression profiles

Peptides without Cys residues could be used to get quantitative information about protein expression profiles. We found that the Δ TRR1 strain exhibits a large number of up-regulated proteins compared to the WT strain. As a result, the distribution of protein expression ratios is tailed on the left side (Figure 3A). To correct this phenomenon, the same procedure was performed on heavy labeled *vs.* light labeled WT yeast cells. It produces a narrower distribution centered on 0 (Figure 3B) and was used to generate the volcano plots shown in

Figure 3 using Perseus software. Two validation tests are performed: $FDR < 0.01$ (p-value equivalent $8 \cdot 10^{-3}$) and $Z\text{-score} > 1$ (supplementary note 2).

We quantified 767 proteins and among them 231 changed their expression profiles (182 up-regulated while 49 down-regulated). Significant proteins are reported in supplementary Table 2. 24 of the up-regulated proteins in $\Delta TRR1$ cells belong to the response to oxidative stress pathways (according to GOTERM_BP, p-value 10^{-16} calculated with DAVID 6.7 [12] (Figure 3C), 15 to oxidative phosphorylation (p-value 10^{-9}), 9 to the TCA cycle (p-value 10^{-6}), 9 to glycolysis (p-value 10^{-6}), and 16 to amino acid biosynthesis pathways (p-value 10^{-5}). 28 of the down-regulated proteins belong to protein translation pathways (GOTERM_BP, p-value 10^{-13}) (Figure 3D). Moreover among the down-regulated proteins we found TRR1 confirming the efficiency of the silencing. Proteomics data are in accord with transcriptomic data in literature [13].



Cysteine redox profiles

Cys redox profiles could be obtained by monitoring Cys containing peptides. As described before, OcSILAC compares relative abundances of the different redox states of peptides in

two conditions. Moreover to evaluate the change in site occupancy we need the protein expression level. For example, a two fold increase of a given oxidized Cys percentage can be either a change of 2% to 4% or a change of 40% to 80%. Here, the OcSILAC procedure provides quantitative data concerning both the variations of oxidized and free thiol Cys containing peptides together with their parent protein abundance. It opens the way towards the discovery of pure redox events. Different levels of information can be distinguished.

In level 1, where only the ratio of one redox species is available, the calculated ratio (either r_{ox} or r_{re}) reflects a redox event if three conditions are fulfilled: 1) protein expression remains unaltered; and if other PTMs on non Cys residues occur on the peptide, 2) they are identical in the two samples, and 3) they follow the same distribution over the redox states of the peptide.

In level 2, where the ratios of one redox species and the relative abundance of the parent protein are available, the calculated ratio (either r_{ox} or r_{re}) reflects a redox event if the previous conditions 2 and 3 are fulfilled. The ratio r gives an additional information that is accounted in the redox event.

In level 3 where the ratios of both redox species and the relative abundance of the parent protein are available, the calculated ratio (either r_{ox} or r_{re}) reflects necessarily a redox event if condition 3 is valid. In this case r_{ox} and r_{re} give redundant information. When they do not behave as complementary values, it indicates that other modified forms of the sequence should be accounted for the detected variation, but where not detected. This avoids false positive redox events. Moreover, the case of PTM variations specific to one redox form (E.g. Cys thiol irreversible oxidations) can be evidenced in certain favorable cases.

The ratio related to protein abundance (r) should be comprised between the values of r_{ox} and r_{re} (for details, see supplementary note 3). The fractions of oxidized Cys (p_{ox}^1 and p_{ox}^2) in the two samples are:

$$p_{ox}^1 = \frac{Ox_1}{Ox_1 + Red_1} = \frac{r - r_{re}}{r_{ox} - r_{re}}$$

$$p_{ox}^2 = \frac{Ox_2}{Ox_2 + Red_2} = \frac{1/r - 1/r_{re}}{1/r_{ox} - 1/r_{re}}$$

The algorithm uses statistical tests to evaluate if r is different from r_{re} or r_{ox} (division by 0, $testox5\%$ and $testre5\%$, Wilcoxon's non parametric test, Student or Welch, see supplementary note 3). Two specific cases are to be treated separately:

$$r_{ox} \approx r \Leftrightarrow p_{ox}^1 \approx p_{ox}^2 \approx 1$$

$$r_{re} \approx r \Leftrightarrow p_{ox}^1 \approx p_{ox}^2 \approx 0$$

If $r \notin [r_{ox}; r_{re}]$ or $r \notin [r_{re}; r_{ox}]$, it could be due to a lack of precision (standard deviation effect) in the above specific cases, or to the occurrence of other undetected differential modifications as described previously.

$\Delta TRR1$ redoxome analysis allows to quantify 2858 unique Cys containing peptides in 1204 proteins. 1808 redox profiles (655 proteins from the total 767 quantified proteins) were corrected by expression level. For 705 Cys residues (385 proteins) r , r_{ox} and r_{re} were calculated and the percentages of reduced and oxidized forms were estimated to evidence eventual side reactions (supplementary Table 3).

Discussion

Statistical analysis on normalized ratios

A first interpretation of data could be performed using the redox ratios normalized by protein expression. The r_{ox} and r_{re} values are divided by r , and the previously described light WT vs. heavy WT experiment was used to generate the volcano plots with Perseus. Since the relative quantification of PTMs is realized using a single peptide, FDR was decreased to 0.005 and the Z-score threshold was increased to 2. Using only r_{ox} and r (or r_{re} and r) (level 2), we cannot distinguish between a pure redox event and another modification. The results are presented in supplementary Table 4 and 5. The normalized ratios of the reduced forms of TSA2, SRX1 and GPX2, known to be involved in redox homeostasis, were found to be significantly down-regulated.

Statistical analysis on non-normalized ratios

The normalization against protein expression profile was used when all ratios were calculated with high accuracy. However, for highly up-regulated proteins (ratios $r < 0.2$), as the ratios decrease for a constant error tolerance, the error's impact increases, precluding any confident quantification. To overcome this limitation, another approach for data analysis could be performed working on the raw redox ratios (Figure 4): r_{re} and r_{ox} ratios in WT- $\Delta TRR1$ sample are respectively compared to their values in WT-WT sample using the volcano plot tool in Perseus. The resulting outliers were accepted if r_{re} or r_{ox} were different from r (testox5% or testred5% in supplementary note 3). Here, the FDR was maintained at 0.005 while Z-score was set back to 1 since standard deviations were no longer affected by error propagation caused by division by r .

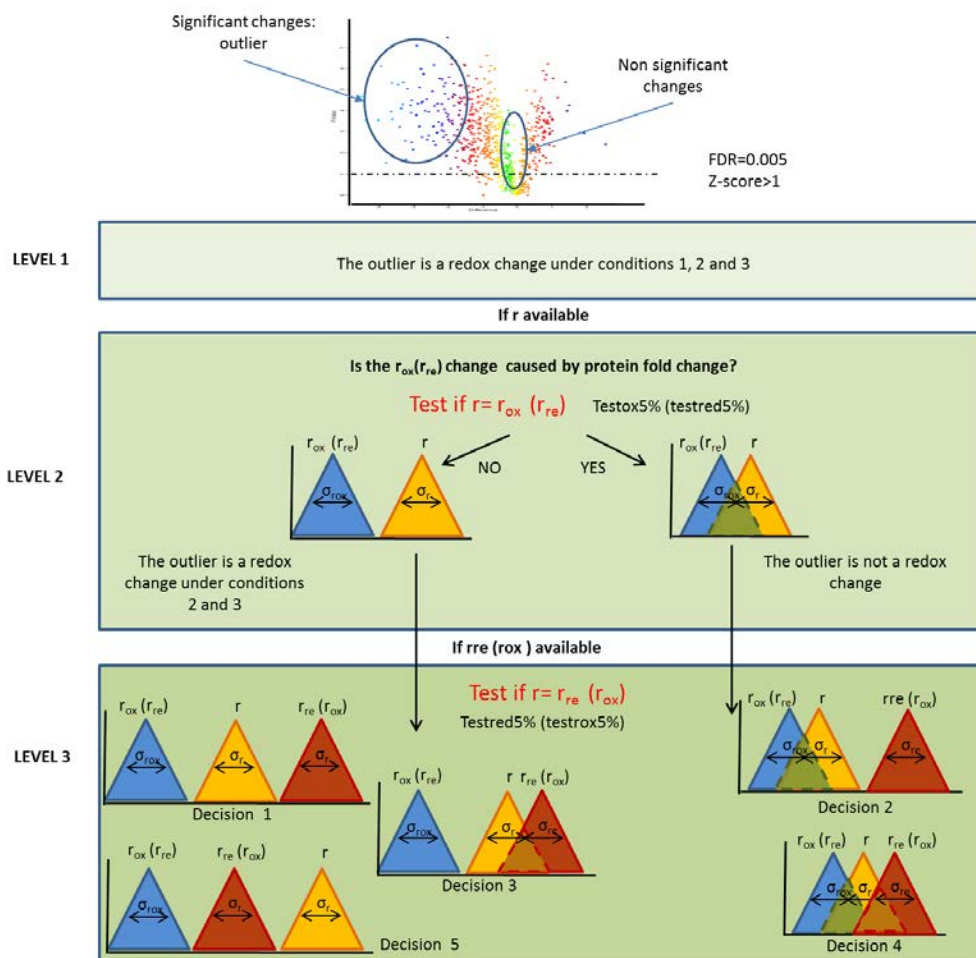


Figure 4 - Schematic representation of data treatment using non normalized redox ratios. The dataset of redox ratios $r_{ox} (r_{re})$ are separately used to build a volcano plot using Perseus. Three major conditions are defined: 1) unaltered protein expression; 2) unaltered parallel equilibria; 3) red/ox unaltered in parallel equilibria. In the specific case of level 3, considering r_{ox} , r_{re} , and r gives 5 scenarios. If $r_{ox} \leq r \leq r_{re}$ or $r_{re} \leq r \leq r_{ox}$, it is possible to estimate the percentage of each redox fraction (Decision 1). The eventual outlier ratios are related to substantial changes in the redox fractions. If $r_{ox} \approx r \leq r_{re}$, the detected cysteine is highly oxidized (Decision 2). The significant change in the reduced fraction is related to moderate changes of the fraction (E.g. 1% to 2%). Similarly the Cys is highly reduced if $r_{re} \approx r \leq r_{ox}$ (Decision 3). If the result is $r_{ox} \approx r \approx r_{re}$, significant changes in redox ratios have to be attributed to the change in protein expression (Decision 4). If r , r_{ox} and r_{re} are determined to be different but $r_{ox} > r_{re} \leq r$ or $r \leq r_{ox} < r_{re}$ the chemical equilibrium between the reduced and the reversibly oxidized forms of the peptide is not respected and an amount of it is converted to another undetected form specifically in one of the two samples (Decision 5). Redox ratios that are not significant are also checked to find false negatives by the comparison of r_{ox} or r_{re} with r . If $r_{ox} (r_{re}) \approx r$ the redox ratio is not a false negative, while in the opposite case it is a false negative.

At level 2, the oxidized fractions of 88 sequences were up-regulated while the reduced fractions of 55 sequences were up-regulated (Supplementary Table 6 and 7). At level 3 (r , r_{ox} and r_{re} available), the oxidized fractions of 18 sequences were up-regulated while the reduced fractions of 10 sequences were up-regulated. Sequences with r_{ox} and r_{re} not found to be outliers when compared between WT-WT and WT-ΔTRR1 were further investigated and

compared to the parent protein's expression level. In this category, with r_{re} and r_{ox} values around 1, and with protein expression profiles significantly different from 1, we found 5 Cys (supplementary Table 8). We observed that 90% of the Cys showed $p^1_{ox} > p^2_{ox}$ confirming the tendency of more oxidation in $\Delta TRR1$ strain. Finally we found 77 Cys containing peptides possibly involved in others equilibriums, since r is not comprised between r_{ox} and r_{re} .

Biological significance

Thioredoxin (TRX) pathway

In $\Delta TRR1$ strain, we find higher basal levels of YAP-1 targets in agreement with previous genomic [13] and proteomics studies [14] (see supplementary Table 2). Higher levels of TRX2 (up-regulated >10 folds) and to a lesser extent TRX1 (up-regulated ~ 1.7 folds) were found [15]. Previous non-reductive western blot analyses showed the accumulation of oxidized TRX in $\Delta TRR1$ strain [9] [15]. Ragu S. *et al.* [15] showed that TRX1 and TRX2 were both fully reduced in WT samples and more oxidized in $\Delta TRR1$.

$\Delta TRR1$ strain has a slow growth. One hypothesis is that oxidized TRXs accumulation triggers the response to general stress through the transcriptional regulators YAP1 and MSN2/4 [15]. The TRX system is the electron donor that permits to recycle oxidized peroxiredoxins. In the present study, these peroxidases are up-regulated, and the catalytic Cys residue of H_2O_2 specific peroxidases TSA1 and TSA2 is more oxidized. TSA2 oxidation rises from 20% at the basal level to 70% in $\Delta TRR1$, while for TSA1 Cys170 was observed to be highly oxidized, and may even be associated to additional modifications probably stemming from hyperoxidation. Furthermore, TSA1 is a substrate to the sulfinic acid reducing enzyme sulfiredoxin SRX1. Here SRX1 is found considerably up-regulated and its oxidized fraction is higher in $\Delta TRR1$ cells in agreement with the hypothesis of hyperoxidation of TSA1, as detected by our method.

Unfolded protein response (UPR), Starvation, NAD(P)H generation.

The $\Delta TRR1$ strain, aside from the activation of oxidative stress related proteins, presents at the basal level different pathway activation/repression. In particular we observed an activation of the respiratory chain (glycolysis, TCA cycle, oxidative phosphorylation), starvation (amino acid biosynthesis), adapted sulfur amino acid biosynthetic pathway and repressed protein translation (Figure 5).

Grant C. *et al* [16] observed in $\Delta TRR1$ basal activation of UPR, that could lead to the activation of amino acid biosynthesis, via Gcn4 pathway [17]. Amino acid biosynthesis needs

substrates from TCA cycle, moreover it was also observed that during starvation oxygen consumption is increased [18] resulting in enhanced respiratory pathway as shown by our data.

The need of NAD(P)H equivalents is reflected also in sulfur uptake. The $\Delta TRR1$ strain has normal sulfate uptake [19] and is auxotroph for methionine. Our results show an unusual behavior of sulfur amino acid biosynthesis. Indeed, as expected, the TRX dependent PAPS-reductase (MET16) is up-regulated coherently with Gcn4 activation [13], [20]. Surprisingly, the following step of sulfur uptake could be a bottleneck of sulfate flux, because of the down-regulation of both the sulfite reductase subunits (MET5 and MET10) that utilize 3 NADPH equivalents to reduce sulfite to sulfide. The reduced activity of the sulfite reductase complex is coherent with the economy of NADPH equivalents in $\Delta TRR1$, but many questions could be raised. i) MET5 and MET10 are under the control of Gcn4. Thus their down-regulation is in contrast with the starvation. Does another regulation factor control the expression of MET5 and MET10? ii) Sulfite reductase down-regulation should lead to SO_3^{2-} accumulation that is toxic for yeast. Is $\Delta TRR1$ a sulfite resistant strain or does another form of sulfite reduction exist? iii) The down-regulation of both sulfite reductase and the methyl cycle raises the question concerning the existence of an alternative pathway for sulfide generation. In particular considering that the enzymes involved in Cys synthesis from homoserine are up-regulated in accordance with the necessity to generate glutathione. The management of sulfide and sulfite in *Saccharomyces Cerevisiae* has an important impact in biotechnologies since it's largely exploited in the wine industry [21].

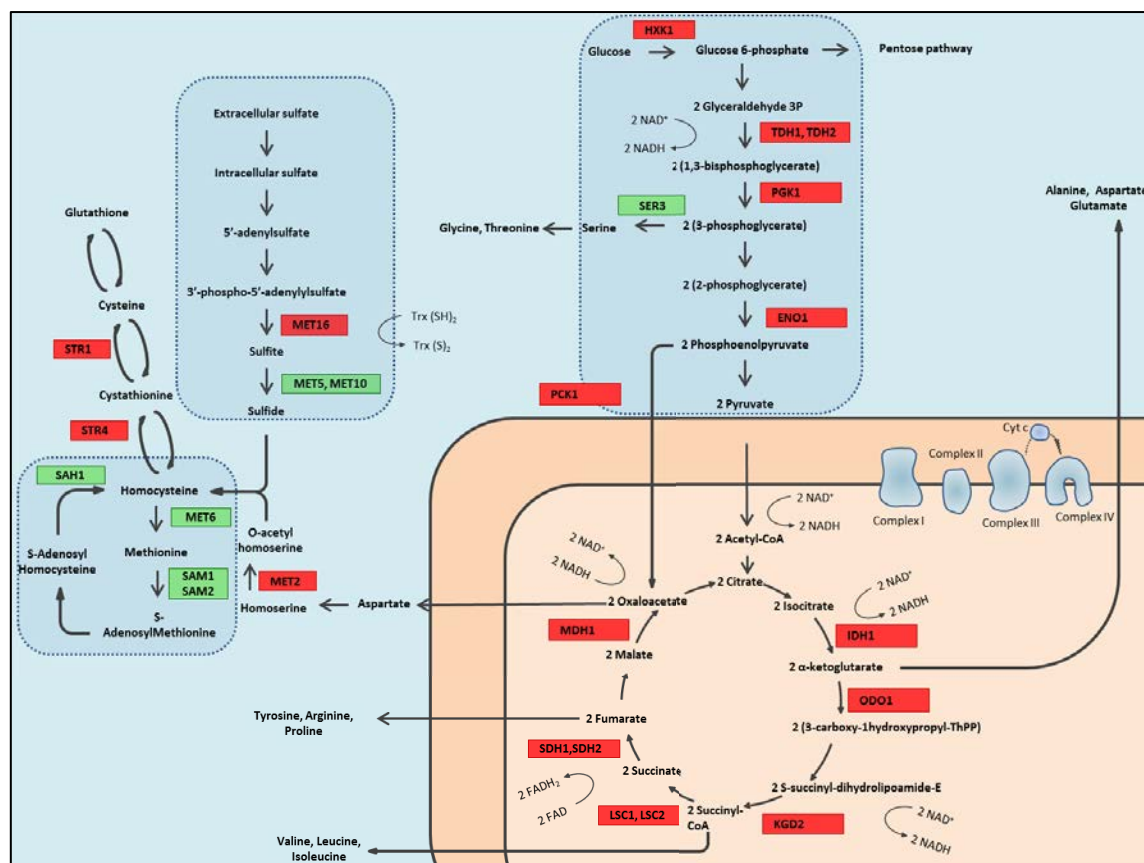


Figure 5 - $\Delta TRR1$ has basal activation of UPR [16]. In accordance with this previous study, we found higher levels of protein disulfide isomerase (PDI) and the BiP protein (KAR2) [22]. The downstream signal of this pathway corresponds to the elongation factor 2 α (eIF2 α) phosphorylation that represses protein translation and activates amino acid biosynthesis, via Gcn4 pathway [17], in accordance with our data (Figure 3D). Previous studies showed the TCA cycle is down regulated during yeast exposition to H₂O₂ [23] and hypoxia [24][25]. The increase of TCA and respiratory pathways seems to suggest that mitochondrial oxidative stress induced by the lack of TRR1 could be less severe compared to the exposition to H₂O₂ or hypoxia. The observed up-regulation of mitochondria ROS detoxifying proteins (TRX3, SOD2, OYE2, OYE3) could help sustaining the increased respiratory activity in the $\Delta TRR1$ strain. The sulfur amino acid biosynthesis is reported to be partially controlled upstream by Gcn4 at the level of sulfur uptake (MET16 and MET5) [26]. In $\Delta TRR1$ we found an increase in the oxidized fraction of MET16 catalytic CYS245 compatible with less TRX activity. However although the absolute concentration of the oxidized Cys is 10 times greater, MET16 up-regulation allows to keep the percentage of the inactive oxidized fraction low, this fraction passes from 3% at the basal level to 12%. Sulfite reductase (MET5 and MET10) down-regulation is in opposition with Gcn4 activation and in accord with NAD(P)H economy. This observation raises the question about the fate of sulfite accumulation and the production of sulfide necessary to synthesize homocysteine. Accumulation of sulfite is toxic for yeast cells unless the FZF1 and SSU1 proteins are activated, increasing the sulfite efflux [27]. Unfortunately, our data miss the coverage of these proteins. The enzymes involved in Cys synthesis (MET2, PDX3, YPR127W) from homoserine are up-regulated in accordance with the necessity to generate glutathione in absence of TRR1. However the reduced level of sulfite reductases producing sulfide is critic to form homocysteine unless homocysteine is obtained via the methyl's cycle using methionine. Surprisingly methyl cycle's proteins (MET6,

SAM1, SAM2, SAH1) are also down-regulated. The down-regulation of both sulfite reductase and the methyl cycle raises the question concerning the existence of an alternative pathway for sulfide generation

Method limitations

OcSILAC originality resides in the simultaneous measurement of changes in redox state and protein expression level giving access to differentiation between redox events, protein expression change and parallel side reactions. However, the robustness of the whole protocol depends on the precision and repeatability of measurements to estimate r , r_{ox} and r_{re} . The biotin switch enrichment step favors oxidized Cys containing peptides only and does not help to enhance the sequence coverage of the parent protein or the detection of the reduced counterpart. Since PTMs are quantified with only one peptide, the quantitative information is less robust. This issue could hinder the comparison between r_{ox} , r_{re} and r and affect the emitted decision. Accurate and reproducible measurements (low standard deviations) are required for statistics and comparison. These limitations could be reduced by applying a targeted MS approach to the OcSILAC protocol. This should increase the ion sampling efficiency, enhancing data quality.

In Table 1 are reported the strengths and the weaknesses of the major gel-free protocol for Cys redox proteomics available.

Table 1 - strengths and weaknesses of a few cys redox strategies

Technique	Strengths	Weaknesses	Ref.
OxICAT	<ul style="list-style-type: none"> • Direct calculation of reduced and oxidized fractions. • Independence of protein expression 	<ul style="list-style-type: none"> • Great difference of concentration between reduced and oxidized forms. • No information about protein expression. • Analysis of one condition at a time • Selective variation of parallel equilibriums could affect the ratios • Costs of reagents 	[2]

ICAT-based protocols	<ul style="list-style-type: none"> • Enrichment of oxidized fraction • Comparison of two samples at once • Protein expression profiles 	<ul style="list-style-type: none"> • Samples are separated during the cysteine labeling steps. Different exposition to O₂ • Additional reactions to calculate protein expression profiles • Use of expensive reagents for protein profiling [3] • Use of deuterium reagent for protein profiling [4] • Selective variation of parallel equilibriums could affect the ratios • No statistical comparison between protein levels and cysteine levels 	[3], [4]
cysTMT-iodoTMT	<ul style="list-style-type: none"> • Enrichment of oxidized fraction • Comparison of six samples at once • Isobaric quantification 	<ul style="list-style-type: none"> • No information about protein expression • Samples are separated during the Cysteine labeling steps. Different exposition to O₂ • Selective variation of parallel equilibriums could affect the ratios • Cost of reagent 	[5], [6]
OcSILAC	<ul style="list-style-type: none"> • Enrichment of oxidized fraction • Protein expression profiles • Comparison of two samples at once • Samples are pooled before cell lysis • Attempt to detect parallel equilibriums • Reduced cost of reagents • No additional reaction to obtain protein expression profiles • Statistical comparison between protein expression and cysteine levels 	<ul style="list-style-type: none"> • Indirect measurement of site occupancy • Necessity of high reproducibility in mass spectrometry analyses 	

Methods

Cell culture and SILAC labeling

The strains used in this study are derived from the Y252 background (MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 leu2-Δ1). The Y252 Δ*TRR1* strain (trr1::KanMX) was deleted and deletion was verified by PCR. Cells are grown in minimal media (SD) (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids, 2% glucose) amino acid supplements as appropriate, at 30 °C. Strains are grown

in SD media supplemented with heavy or light lysine and arginine. Fresh media is added regularly to keep the strains in mid-exponential phase (in a range from OD 600 nm 0.1 to 0.8). After 12 generations, cells are counted using coulter (Beckman coulter z2) and 10^8 or 10^9 cells were collected. The strains grown with heavy and light amino-acids were pooled and TCA (20% final concentration) was added. Cells are centrifuged at 4000 rpm for 5 min at 4 °C, and the pellets are washed once with TCA 20%. Finally, cells are centrifuged at 15000 rpm for 10 min at 4 °C, the supernatant is discarded and the pellet is frozen on dry ice for 10 min. Cells are kept at -80 °C until processing.

OcSILAC procedure

Aliquots of 2×10^8 cells were resuspended in 600 μ L of TCA 20 %, previously stored at 4 °C. Around 600 μ L of glass beads are added and cells were vortexed for 1 min then put in a glace-bath for 1 min, this cycle was repeated five times. Samples were then centrifuged for 1h at 4 °C at 13 000 rpm. Supernatant was discarded and the pellet was washed three times with 1mL of cold acetone. Protein pellets were resuspended with 600 μ L of denaturing buffer (Urea 6 M, Tris 100 mM pH 8.8, 1% octyl β -glucopyranoside, protease inhibitors) supplemented with 200 mM (final concentration) of iodoacetamide. This condition was already demonstrated saturating in our previous application [28]. Reduced thiol alkylation was carried out for 1h at room temperature, under stirring in the dark. Insoluble pellet was removed and proteins were precipitated by adding 600 μ L of TCA 20% followed by centrifugation for 1h at 4 °C at 13 000 rpm. Protein pellets were then resuspended in denaturant buffer supplemented with 20 mM DTT (final concentration) and the reaction was carried out for 2h at 37 °C. Reductant was removed by TCA precipitation as described above. Samples were then resuspended in 600 μ L of denaturant buffer supplemented with biotin-HPDP 0.5 mM (final concentration, estimated 200 fold molar excess in respect to protein amount), the reaction was carried out for 1h at 37 °C under stirring. Reagents were removed by TCA precipitation and then samples were resuspended in 100 μ L of ammonium bicarbonate 50 mM for digestion with 2 μ g of trypsin. Protein hydrolysis was carried out for 18h at 37 °C. The peptide solution was diluted 3 folds with PBS and loaded on 50 μ L of slurry streptavidin resin previously washed three times with PBS. Peptide solutions were incubated for 1h at room temperature under stirring. The solution containing the unbound fraction was recovered, acidified with 0.1% TFA and stored at -20 °C. The resin was washed five times with 400 μ L of PBS then the enriched fraction was eluted with 50 μ L of DTT 20 mM, acidified with 0.1% TFA and stored at -20 °C.

LC-MS/MS

Samples were purified by Zip-Tip (Millipore) before the LC-MS/MS analysis eluting in 2 μ L of 60% ACN, 0.1% formic acid in water. Desalted samples were then diluted with 18 μ L of 0.1% formic acid in water. Five microliters of each sample were fractionated on a capillary reverse phase column (nano C18 Dionex Acclaim PepMap100, 75 μ m i.d. x 15cm) at constant flow rate of 220 nL/min, with a gradient of 2% to 50% of buffer B in 180 min; buffer A: 98% water, 2% ACN, 0.1% formic acid; buffer B: 90% ACN, 10% water, 0.1% formic acid. LC was directly coupled to a QqOrbitrap mass spectrometer (Q Exactive, ThermoFisher Scientific). MS experiments consisted of a survey MS scan (400 to 2 000 m/z; resolution 70 000) followed by an MS/MS analysis of the most 10 intense precursors, with a dynamic exclusion of 30 s of the previously fragmented precursors. Each sample was analyzed in triplicate runs.

Data Analysis

Database analysis was performed using MaxQuant (version 1.3.0.5) with Swiss-Prot database (version 2015_05). Methionine oxidation and cysteine carbamidomethylation were selected as variable modifications. First search error tolerance was 20 ppm while main search error tolerance was set to 6 ppm. MS/MS search was performed with 20 ppm of error tolerance. Protein identification was performed with a False Discovery Rate (FDR) of 1%. Quantitative profiles were generated by reprocessing the data exported from MaxQuant as illustrated in supplementary note 1.

Since there are no adapted bioinformatics tools for the treatment of redox data, we developed our own in-house Matlab algorithm (supplementary note 2) to calculate protein expression profiles and cysteine containing peptide ratios. The algorithm performs the following steps sequentially (detailed information reported in supplementary note 3):

- Elimination of outlier values for each peptide ratio
- Elimination of non-cysteine containing peptides shared between two or more proteins
- Protein expression profile are calculated as an average (\bar{r}) of all remaining peptides ratios without cysteines
- For each individual cysteine containing peptide in a given redox state, the measured ratios are averaged. Depending on the redox state of cysteine we can obtain r_{ox} (averaged ratio of the oxidized form), r_{re} (averaged ratio of reduced

form) and/or r_{mi} (averaged ratio of the mixed form, for two or more cysteine containing peptides).

- When for a given cysteine containing peptides the ratios r_{ox} , r_{re} and the associated r are calculated, the percentage of oxidized cysteine in sample 1 (p^1_{ox}) and 2 (p^2_{ox}) are estimated. Moreover, r_{re} and r_{ox} are compared to r to evaluate if p^1_{ox} and p^2_{ox} are both approximately 100%
- According to the values of r_{ox} , r_{re} and r a decision is taken. In particular “1” means that p^1_{ox} and p^2_{ox} are calculated. The decision “2” means that the percentage of oxidized cysteine is approximately 100% in both samples. The decision “3” means that the percentage of reduced cysteine is approximately 100% in both the samples. The decision “4” means that no variation is detected and eventual significant changes in ratios have to be attributed to the change in expression profile. The decision “5” means that the postulate that the only equilibriums are the cysteine oxidation and the protein synthesis is false and that other modifications can occur to the studied peptide.

Quantitative data mining was performed using Perseus 1.5.1.6.

References

1. Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal*. 2010;3(104):ra3–ra3.
2. Leichert LI, Gehrke F, Gudiseva HV, Blackwell T, Ilbert M, Walker AK, et al. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 17;105(24):8197–202.
3. Fu C, Wu C, Liu T, Ago T, Zhai P, Sadoshima J, et al. Elucidation of Thioredoxin Target Protein Networks in Mouse. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2009 Jul;8(7):1674–87.
4. García-Santamarina S, Boronat S, Domènech A, Ayté J, Molina H, Hidalgo E. Monitoring in vivo reversible cysteine oxidation in proteins using ICAT and mass spectrometry. *Nat Protoc*. 2014 May;9(5):1131–45.
5. Behring JB, Kumar V, Whelan SA, Chauhan P, Siwik DA, Costello CE, et al. Does reversible cysteine oxidation link the Western diet to cardiac dysfunction? *FASEB J*. 2014 May 1;28(5):1975–87.

6. Murray CI, Uhrigshardt H, O'Meally RN, Cole RN, Eyk JEV. Identification and Quantification of S-Nitrosylation by Cysteine Reactive Tandem Mass Tag Switch Assay. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Feb 1;11(2):M111.013441.
7. Go Y-M, Jones DP. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1780(11):1273–90.
8. Fagerberg L, Stadler C, Skogs M, Hjelmare M, Jonasson K, Wiking M, et al. Mapping the Subcellular Protein Distribution in Three Human Cell Lines. *J Proteome Res*. 2011 Aug 5;10(8):3766–77.
9. Kumar C, Igarria A, D'Autreaux B, Planson A-G, Junot C, Godat E, et al. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J*. 2011 May 18;30(10):2044–56.
10. Jaffrey SR, Snyder SH. The Biotin Switch Method for the Detection of S-Nitrosylated Proteins. *Sci Signal*. 2001 Jun 12;2001(86):p11–p11.
11. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2002 May 1;1(5):376–86.
12. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2008 Dec;4(1):44–57.
13. Carmel-Harel O, Stearman R, Gasch AP, Botstein D, Brown PO, Storz G. Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 2001 Feb;39(3):595–605.
14. Hasan R, Leroy C, Isnard A-D, Labarre J, Boy-Marcotte E, Toledano MB. The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol*. 2002 Jul;45(1):233–41.
15. Ragu S, Dardalhon M, Sharma S, Iraqui I, Buhagiar-Labarchède G, Grondin V, et al. Loss of the Thioredoxin Reductase Trr1 Suppresses the Genomic Instability of Peroxiredoxin tsa1 Mutants. Netto LES, editor. *PLoS ONE*. 2014 Sep 23;9(9):e108123.
16. Trotter EW, Grant CM. Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 2005 Feb;4(2):392–400.

17. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003 Mar;11(3):619–33.
18. Petti AA, Crutchfield CA, Rabinowitz JD, Botstein D. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 8;108(45):E1089–98.
19. Toledano MB, Delaunay-Moisan A, Outten CE, Igarria A. Functions and Cellular Compartmentation of the Thioredoxin and Glutathione Pathways in Yeast. *Antioxid Redox Signal*. 2013 May;18(13):1699–711.
20. García-Santamarina S, Boronat S, Calvo IA, Rodríguez-Gabriel M, Ayté J, Molina H, et al. Is oxidized thioredoxin a major trigger for cysteine oxidation? Clues from a redox proteomics approach. *Antioxid Redox Signal*. 2013 May 1;18(13):1549–56.
21. Cordente AG, Heinrich A, Pretorius IS, Swiegers JH. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res*. 2009 May;9(3):446–59.
22. Kohno K, Normington K, Sambrook J, Gething MJ, Mori K. The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol*. 1993 Feb;13(2):877–90.
23. Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler JM, Kieffer S, Perrot M, et al. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998 Aug 28;273(35):22480–9.
24. Cui C, Zhou T, Li J, Wang H, Li X, Xiong J, et al. Proteomic analysis of the mouse brain after repetitive exposure to hypoxia. *Chem Biol Interact*. 2015 Jul 5;236:57–66.
25. Fu Z, Verderame TD, Leighton JM, Sampey BP, Appelbaum ER, Patel PS, et al. Exometabolome analysis reveals hypoxia at the up-scaling of a *Saccharomyces cerevisiae* high-cell density fed-batch biopharmaceutical process. *Microb Cell Factories*. 2014;13(1):32.
26. Thomas D, Surdin-Kerjan Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 1997 Dec;61(4):503–32.
27. Wu C-Y, Roje S, Sandoval FJ, Bird AJ, Winge DR, Eide DJ. Repression of sulfate assimilation is an adaptive response of yeast to the oxidative stress of zinc deficiency. *J Biol Chem*. 2009 Oct 2;284(40):27544–56.

28. Chiappetta G, Ndiaye S, Igbaria A, Kumar C, Vinh J, Toledano MB. Proteome Screens for Cys Residues Oxidation. In: Methods in Enzymology [Internet]. Elsevier; 2010 [cited 2015 Jun 22]. p. 199–216. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007668791073010X>

IV.1.2 Commentaires

L'application de la stratégie OcSILAC au modèle de levure Δ TRR1 représente la partie majeure du travail effectué pendant cette thèse. L'avancement de notre recherche nous a menés progressivement à l'établissement des conditions dans lesquels nos résultats étaient valables. Ces conditions sont directement liées au niveau d'information auquel nous avons accès. Avec OcSILAC nous déterminons le profil d'expression, le rapport de la forme oxydée d'un peptide et le rapport de la forme réduite. Plus nous avons d'informations, moins de conditions s'imposent pour émettre une conclusion sur l'évènement observé.

Considérons le peptide hypothétique CHAKER contenant donc une cystéine et une arginine. Pour cet exemple, ce peptide peut exister sous différentes formes: avec une cystéine réduite ou oxydée (ox) et avec une arginine carbonylée (car) ou non, ces formes peuvent être détectées ou non suite à notre analyse. Dans un premier cas, nous pouvons imaginer la détection de la forme contenant uniquement une cystéine oxydée. Posons les valeurs suivantes pour illustrer ce cas de figure :

Tableau 7 - Exemple numérique 1

Forme peptidique	Nombre de molécules dans WT	Nombre de molécules dans Δ TRR1
C(ox)HAKER	15	30
C(ox)HAKER(car)		
CHAKER(car)		
CHAKER		
Total		

Sachant que la souche WT est obtenue en isotopes lourds et que la souche Δ TRR1 est obtenue en isotopes légers et que $r_{ox} = H/L$, nous ne connaissons que la valeur de r_{ox} qui est de 0,5. Il est possible de conclure que cela représente un évènement redox si et seulement si :

- Le profil d'expression ne change pas
- Les autres PTMs sur ce peptide (la carbonylation dans ce cas) ne varient pas
- Dans le cas d'une variation des autres PTMs, toutes les formes présentent les mêmes distributions des fractions redox.

Dans les autres cas, nous ne pouvons pas conclure. Ce cas est le plus évident.

Imaginons maintenant que nous avons en plus la valeur de r . Posons les valeurs suivantes :

Tableau 8 - Exemple numérique 2

Forme peptidique	Nombre de molécules dans WT	Nombre de molécules dans Δ TRR1
C(ox)HAKER	15	30
C(ox)HAKER(car)		
CHAKER(car)		
CHAKER		
Total	100	140

Nous avons la valeur de r_{ox} qui est de 0,5 et la valeur de r qui est de 0,7. La valeur normalisée de $r_{ox} = 0,5/0,7 = 0,7$. Ce chiffre indique une augmentation de la fraction oxydée chez Δ TRR1. Il est possible de conclure que ceci est un évènement redox si et seulement si :

- Les autres PTMs sur ce peptide ne varient pas
- Dans le cas d'une variation des autres PTMs, toutes les formes présentent les mêmes distributions des fractions redox.

Sans ces conditions, nous ne pouvons pas distinguer un évènement redox d'un changement qui touche la modification de l'arginine comme le montrent les deux cas de figure suivants :

Tableau 9 - Exemple numérique 3

A			B		
Forme peptidique	Nombre de molécules dans WT	Nombre de molécules dans Δ TRR1	Forme peptidique	Nombre de molécules dans WT	Nombre de molécules dans Δ TRR1
C(ox)HAKER	15	30	C(ox)HAKER	15	30
C(ox)HAKER(car)			C(ox)HAKER(car)	50	35
CHAKER(car)			CHAKER(car)		
CHAKER	30	15	CHAKER		
Total	100	140	Total	100	140

En effet, en l'absence de détection du peptide carbonylé sur l'arginine et du peptide portant la cystéine réduite (sans la carbonylation), il est possible d'avoir divers cas de figure comme le montre l'exemple du Tableau 9. Sans la détection de ces peptides, il n'est pas possible de déterminer si les 15 molécules additionnelles du peptide C(ox)HAKER dans Δ TRR1 proviennent de l'oxydation de la cystéine du peptide CHAKER et donc un évènement redox réel (cas de figure A) ou si ces 15 molécules proviennent de la décarbonylation du peptide C(ox)HAKER(car), que nous arrivons ainsi à détecter (cas de figure B, modification d'une PTM qui coexiste et non pas un évènement redox)

Finalement, prenons le cas où nous avons toutes les informations que nous pouvons obtenir avec la méthode OcSILAC: r_{ox} , r_{re} et r selon les valeurs suivantes:

Tableau 10 - Exemple numérique 4

Forme peptidique	Nombre de molécules dans WT	Nombre de molécules dans Δ TRR1
C(ox)HAKER	15	30
C(ox)HAKER(car)		
CHAKER(car)		
CHAKER	30	30
Total	100	140

Dans ce cas, $r_{ox} = 0,5$; $r_{re} = 1$ et $r = 0,7$. Nous pouvons calculer les pourcentages des fractions réduite et oxydée. Cependant, pour pouvoir conclure quant à un évènement redox il est nécessaire que toutes les formes modifiées non détectées du peptide présentent les mêmes fractions oxydée et réduite en ce qui concerne la cystéine. Si cette dernière condition n'est pas satisfaite, les valeurs trouvées ne reflètent plus la réalité comme le montre l'exemple suivant :

Tableau 11 - Exemple numérique 5

A			B		
Forme peptidique	Nombre de molécules dans WT	Nombre de molécules dans Δ TTR1	Forme peptidique	Nombre de molécules dans WT	Nombre de molécules dans Δ TTR1
C(ox)HAKER	15	30	C(ox)HAKER	15	30
C(ox)HAKER(car)	50	75	C(ox)HAKER(car)	55	35
CHAKER(car)	5	5	CHAKER(car)	0	45
CHAKER	30	30	CHAKER	30	30
Total	100	140	Total	100	140
Ratio	Mesuré	Réel	Ratio	Mesuré	Réel
r_{ox}	15/30=0,5	65/105=0,6	r_{ox}	15/30=0,5	70/65=1,1
r_{re}	30/30=1	35/35=1	r_{re}	30/30=1	30/75=0,4
r_{ox} normalisé	0,5/0,7=0,7	0,6/0,7=0,8	r_{ox} normalisé	0,5/0,7=0,7	1,1/0,7=1,6
r_{re} normalisé	1/0,7=1,4	1/0,7=1,4	r_{re} normalisé	1/0,7=1,4	0,4/0,7=0,6

Dans cet exemple, les différentes formes du peptide (avec ou sans carbonylation de l'arginine) ne présentent pas les mêmes distributions entre les fractions réduite et oxydée. Les valeurs calculées concernent les formes détectées alors que les valeurs redox réelles sont une moyenne pondérée de toutes les formes qui existent. Ici encore, plusieurs cas de figure se présentent. Dans l'exemple numérique A du Tableau 11, bien que les valeurs des ratios changent, les tendances en termes d'évènement redox se maintiennent. En revanche, dans l'exemple numérique B, la non prise en compte des espèces carbonylées conduit à une inversion des tendances redox observées par rapport à la réalité. Cette limitation est vraie pour toutes les méthodes quantitatives des PTMs.

Dans le cas où les conditions établies sont vérifiées, nous pouvons détecter la présence d'équilibres parallèles sur le peptide étudié. Le cas d'une suroxydation irréversible de la cystéine en acides sulfinique et sulfonique nous intéresse particulièrement. Ainsi, nous avons retraité nos données avec le logiciel PEAKS Studio possédant une fonction de recherche non discriminante et en masse des modifications post-traductionnelles. Cette fonction permet la recherche de 485 modifications et accorde un score au résultat en prenant en compte des paramètres tels que l'identification de la version non modifiée et la rareté de la modification [169]. Les résultats de recherche PEAKS permettent la détection d'un nombre de peptides contenant des cystéines suroxydées, dont le cas de la cystéine catalytique de la peroxyrédoxine TSA1 évoqué dans l'article. Le spectre MS/MS du peptide est présenté à la Figure 44.

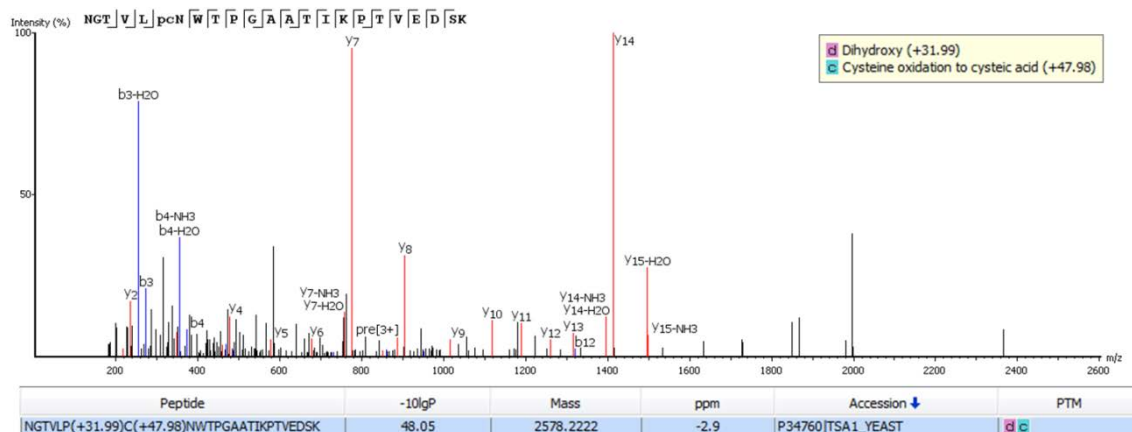


Figure 44 - Spectre MS/MS du peptide NGTVLP^CNWTPGAATIKPTVEDSK contenant le cystéine catalytique de la peroxyrédoxine TSA1.

Le peptide en question est identifié avec une proline oxydée et une cystéine oxydée en acide sulfonique.

Il est important de noter également que le calcul des pourcentages des fractions réduite et oxydée d'une cystéine, ainsi que l'éventuelle détection d'équilibres parallèles, est largement dépendant de la qualité et robustesse des données générées. Or dans un cas comme celui du mutant Δ TRR1 avec une importante variation du niveau d'expression de nombreuses protéines, nous avons dû faire face à deux défis liés à ce phénomène: i) la nécessité d'avoir recours à une normalisation externe des données, en utilisant un échantillon WT (H) *vs.* WT (L), pour tenir compte du fait que la distribution de la population des profils d'expression dans WT *vs.* Δ TRR1 présente un biais important et ii) la variation importante des niveaux d'expression impliquant que la protéine (ou la cystéine) étudiée présente des ratios H/L $<$ à 0,2 (soit une surexpression d'un facteur supérieur à 5) avec des écarts-types importants. Nous avons constaté que le logiciel MaxQuant générait même dans certains de ces cas des données quantitatives non fiables et même totalement fausses. Un cas très important pour nous est celui du peptide contenant le site catalytique de la thiorédoxine-2 (TRX2) : LVVVDFFATWCGPCK. Selon la recherche MaxQuant, la forme oxydée de ce peptide est détectée avec un ratio H/L $r_{ox} = 8$ indiquant donc une présence plus importante de la forme oxydée chez le témoin WT. En inspectant le spectre MS acquis pour ce peptide nous trouvons un résultat différent (Figure 45). Le peptide non marqué provenant de la souche Δ TRR1 est détecté sous forme d'ion bichargé et possède un rapport m/z de 842,91 alors que le peptide marqué avec une lysine lourde et provenant de la souche WT est attendu à la valeur de m/z de 846,91.

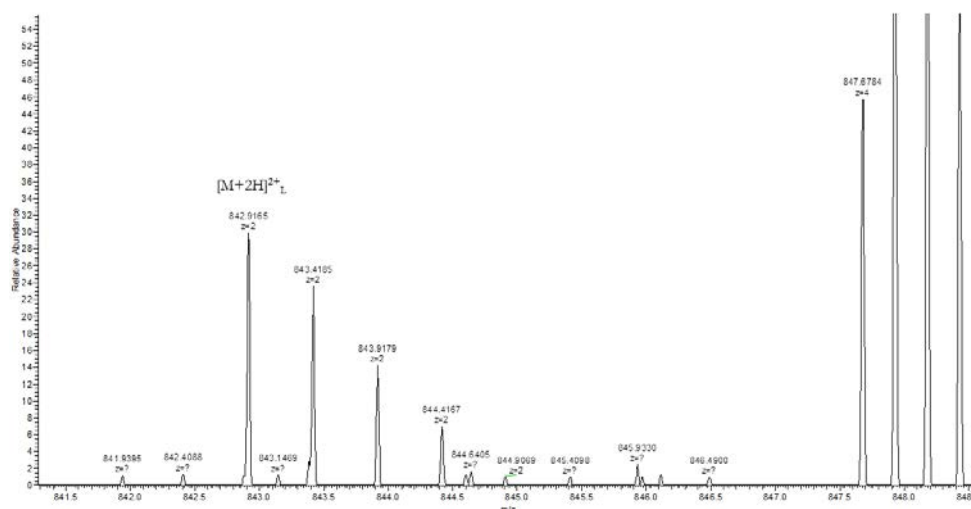


Figure 45 - Spectre MS acquis pour la forme oxydée du peptide LVVVDFFATWCGPCK, contenant le site catalytique de la thiorédoxine-2

La forme oxydée n'a pas pu donc être détectée chez la souche WT. La quantification obtenue est fautive et soulève la question de la fiabilité des rapports déterminés par MaxQuant dans des cas extrêmes comme celui de l'absence d'un des deux partenaires lourd et léger. Le traitement de ce type de donnée soulève lui-même d'autres questions: Comment traiter les valeurs manquantes? Est-ce qu'une quantification est possible dans ce cas? L'attribution de la valeur du bruit au partenaire non détecté est-elle une solution adéquate sachant que la valeur du rapport dans ce cas sera déterminée par l'intensité du partenaire détecté dans le spectre MS?

IV.2 Une première application du protocole OcSILAC avec fractionnement subcellulaire : cas du cancer anaplasique de la thyroïde

IV.2.1 Introduction

Le cancer de la thyroïde est une des pathologies les plus importantes du système endocrinien, avec un taux d'incidence en croissance en Europe et aux Etats-Unis. Le cancer anaplasique de la thyroïde est très agressif, avec un taux moyen de survie entre quatre et neuf mois après le diagnostic [170]. Il n'existe pas à présent de traitement pour ce cancer. Des études sont actuellement en cours afin d'élucider les mécanismes et voies de signalisation impliqués dans le développement de la pathologie dans le but de proposer des traitements adaptés. Notre laboratoire fait partie des groupes impliqués dans ces études par notre collaboration avec le groupe du Dr. Gennaro Chiappetta (Istituto

Nazionale Tumori "Fondazione Pascale", Naples, Italie). La thématique avait été couverte pendant une partie de la thèse du Dr. Sophie Liuu.

Parmi les protéines impliquées dans cette pathologie, la protéine BAG3 (*B-cell lymphoma-2-associated athanogene 3*) est une des plus étudiées [171], [172]. La famille des protéines BAG est un groupe de protéines co-chaperons qui interagissent avec l'Hsp70 (*Heat shock protein 70*). Les membres de cette famille sont très conservés avec des homologues chez la levure, les invertébrés, les amphibiens, les mammifères et les plantes, suggérant un rôle biologique commun [173]. Chez l'Homme, BAG3 est exprimée constitutivement dans très peu de types cellulaires (les myocytes par exemple) et dans de nombreux cancers comme le cancer anaplasique de la thyroïde, le mélanome et l'ostéosarcome [174]. Dans ces cancers, BAG3 favorise la survie cellulaire en influençant la fonction de l'Hsp70. L'Hsp70 interagit avec certaines protéines qui régulent l'apoptose et la survie cellulaire. Parmi ces protéines figure la sous-unité IKK γ du complexe I κ B (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B*) qui inhibe le facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear factor kappa-B*) impliqué dans la réponse immunitaire et la prolifération cellulaire. Dans les conditions physiologiques, l'Hsp70 interagit avec la sous-unité IKK γ , inhibant ainsi l'activité de NF- κ B. La surexpression de BAG3 perturbe l'interaction Hsp70- IKK γ menant à la libération d'IKK γ et l'activation de NF- κ B qui serait impliqué dans la prolifération et le maintien des cancers évoqués [174].

La protéine BRAF (*B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) est une autre protéine interagissant avec l'Hsp70. La perturbation de cette interaction mène à l'activation de la voie de signalisation ERK (*Extracellular-signal-regulated kinases*) impliquée également dans la survie des cellules cancéreuses [170].

La protéine BAG3 serait ainsi une cible potentielle pour des traitements anticancéreux. Le traitement de cellules cancéreuses avec des petits ARN interférents (siRNA) empêchant l'expression du gène *bag3* mène à la réduction de la croissance des cellules cancéreuses ou la réduction de la tumeur [170], [174]. Nous avons ainsi choisi d'appliquer notre protocole OcSILAC adapté au fractionnement subcellulaire pour comparer une culture de cellules non traitées de cancer anaplasique de la thyroïde (souche 8505C) à une culture de la même souche ayant reçu le traitement au siRNA *bag3*.

IV.2.2 Résultats et discussions

IV.2.2.1 Niveau d'expression des protéines

L'extrait des protéomes des cellules 8505C et des cellules ayant subi le traitement *sibag3* a été soumis au protocole OcSILAC adapté au fractionnement subcellulaire. L'analyse LC-MS suivie du traitement bio-informatique a permis l'identification de 1034 protéines et la quantification de 685 (2 peptides minimum). L'exploitation des données a été effectuée avec le logiciel Perseus afin de déterminer les protéines dont le niveau d'expression change d'une manière significative. Le test de *Significance A* permet de déterminer les valeurs r (représentant le ratio du niveau d'expression d'une protéine dans la souche 8505C/la souche *sibag3*) qui s'écartent de la population supposée comme normale. Il attribue un score sous la forme d'une valeur-p. La valeur-p représente la probabilité d'obtenir un tel résultat s'écartant de la population, sous l'hypothèse d'une distribution normale [167]. Les protéines avec une valeur-p $< 0,05$ ont été considérées comme significativement sur ou sous-exprimées. Ainsi, un changement significatif du niveau d'expression a été constaté dans 73 cas, avec 42 protéines surexprimées chez les cellules traitées *sibag3* (14 dans la fraction CEB, 12 dans la fraction MEB et 21 dans les fractions NEB) et 29 protéines sous-exprimées chez ces mêmes cellules (14 dans la fraction CEB, 6 dans la fraction MEB et 11 dans les fractions NEB). Les protéines surexprimées sont présentées au Tableau 12, alors que les protéines sous-exprimées sont présentées au Tableau 13.

Tableau 12 - Protéines surexprimées dans la souche traitée *sibag3*. (§)Protéine détectée comme significative dans l'étude SILAC classique. (*)Protéine observée uniquement avec la stratégie OcSILAC.

Protéine	Identifiant UniProt	r	Fraction	Valeur-p
39S ribosomal protein L28, mitochondrial *	Q13084	0.61	MEB	4.9E-02
40S ribosomal protein S27	P42677	0.63	CEB	6.8E-04
ATP synthase subunit d, mitochondrial ‡	O75947	0.28	NEB	3.6E-02
Catalase	P04040	0.44	MEB	2.6E-02
Chromobox protein homolog 3	Q13185	0.58	CEB	3.7E-02
Copine-1	B0QZ18	0.60	CEB	2.2E-02
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	P13073	0.38	NEB	8.2E-06
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	P13073	0.44	MEB	5.0E-06
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial *	P20674	0.54	NEB	2.0E-03
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial *	P20674	0.17	MEB	1.2E-04
Dermcidin *	P81605-2	0.16	NEB	1.5E-37
Electron transfer flavoprotein subunit beta ‡	P38117-2	0.63	NEB	3.6E-02

G-rich sequence factor 1 *	Q12849	0.57	MEB	5.4E-03
Heat shock protein beta-1	P04792	0.62	CEB	4.4E-02
Heterochromatin protein 1-binding protein 3 *	Q5SSJ5	0.04	NEB	2.4E-02
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 ‡	P07910	0.07	MEB	3.6E-02
Histone H2A type 1 *	P0C0S8	0.15	CEB	3.6E-02
Histone H2A type 1-C *	Q93077	0.63	CEB	1.9E-02
Histone H4	P62805	0.48	CEB	1.9E-02
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	P12268	0.57	NEB	3.7E-02
Lactotransferrin *	P02788	0.56	NEB	1.2E-02
Prelamin-A/C	P02545	0.57	CEB	1.4E-09
Prelamin-A/C	P02545-2	0.59	CEB	3.2E-02
Lipocalin-1 *	P31025	0.61	NEB	3.2E-02
Lysozyme C *	P61626	0.61	NEB	1.6E-18
Membrane-associated progesterone receptor component 1	O00264	0.61	NEB	2.1E-54
Neutral amino acid transporter B(0)	Q15758	0.33	MEB	2.4E-02
Non-specific lipid-transfer protein	P22307	0.47	NEB	4.9E-02
Non-specific lipid-transfer protein	P22307	0.59	MEB	2.6E-02
Nuclear pore complex protein Nup93 *	Q8N1F7	0.36	NEB	4.3E-03
Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	Q9UHX1	0.51	NEB	9.5E-20
Prefoldin subunit 2	Q9UHV9	0.63	CEB	9.6E-03
Procollagen galactosyltransferase 1	Q8NBj5	0.63	NEB	2.2E-02
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	O00469-2	0.57	MEB	3.6E-02
Protein-lysine 6-oxidase *	P28300	0.56	MEB	1.9E-02
Pyruvate carboxylase, mitochondrial *	P11498	0.58	MEB	3.7E-05
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	P08559-4	0.58	NEB	3.6E-02
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 *	Q9UN86	0.60	CEB	1.2E-04
Reticulon-4 ‡	Q9NQC3-2	0.42	NEB	4.4E-02
Reticulon-4 ‡	Q9NQC3-2	0.55	MEB	1.9E-02
Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	P26368	0.34	CEB	6.1E-04
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	P49755	0.42	NEB	2.5E-05
Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	P49748-3	0.59	NEB	2.9E-02
Vimentin	P08670	0.59	CEB	9.6E-03
WW domain-binding protein 11 *	Q9Y2W2	0.08	NEB	6.8E-04
Zinc finger protein 638 *	Q14966	0.55	CEB	7.4E-03
Zinc-alpha-2-glycoprotein *	P25311	0.56	NEB	9.9E-23

Tableau 13 - Protéines sous-exprimées dans la souche traitée *si_{bag3}*. (‡)Protéine détectée comme significative dans l'étude SILAC classique. (*)Protéine observée uniquement avec la stratégie OcSILAC.

Protéine	Identifiant Uniprot	r	Fraction	Valeur-p
60S ribosomal protein L35a	P18077	1.42	CEB	1.4E-02
A-kinase anchor protein 12	Q02952	1.45	CEB	9.0E-03
BolA-like protein 2	Q9H3K6	1.37	CEB	2.8E-02

Calcyclin-binding protein	Q9HB71	1.52	NEB	3.5E-02
Coactosin-like protein ‡	Q14019	1.39	CEB	2.1E-02
Coronin	A7MAP1	1.51	NEB	3.8E-02
Elongation factor 1-alpha 2 *	Q05639	1.52	NEB	3.5E-02
Eukaryotic translation initiation factor 4B	E7EX17	1.35	CEB	3.6E-02
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 *	P63241-2	1.60	MEB	3.3E-02
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 *	P63241-2	1.69	NEB	9.1E-03
F-actin-capping protein subunit beta	P47756	1.68	NEB	9.8E-03
Fatty acid-binding protein, epidermal	Q01469	1.45	CEB	9.0E-03
GTP-binding nuclear protein Ran	J3KQE5	1.62	NEB	2.8E-02
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	Q9BUJ2	1.55	NEB	3.5E-02
Interstitial collagenase	P03956	1.73	NEB	6.5E-03
Importin-5	O00410-3	1.41	CEB	1.6E-02
L-lactate dehydrogenase A chain ‡	P00338-3	1.52	NEB	3.5E-02
Nuclear autoantigenic sperm protein	P49321-3	1.61	MEB	3.1E-02
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	P62942	1.77	MEB	8.4E-03
Phosphoglycerate kinase 1	P00558	1.52	NEB	4.7E-02
Phosphoserine aminotransferase	Q9Y617	1.57	CEB	1.4E-03
Purine nucleoside phosphorylase	P00491	1.56	CEB	1.7E-03
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 ‡	Q13283	1.57	MEB	4.2E-02
Serum deprivation-response protein ‡	O95810	1.66	MEB	2.1E-02
Serum deprivation-response protein ‡	O95810	1.48	NEB	1.6E-02
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	Q9H299	1.39	CEB	2.1E-02
Sialic acid synthase	Q9NR45	1.36	CEB	3.2E-02
Thioredoxin	P10599	1.71	CEB	1.4E-04
Thioredoxin domain-containing protein 17	Q9BRA2	1.55	CEB	2.0E-03
Transaldolase	P37837	1.42	CEB	1.4E-02
Transgelin-2 ‡	P37802	1.85	MEB	4.2E-03

Parmi les protéines dont le profil d'expression subit un changement significatif figurent des protéines repérées également dans une autre étude de comparaison de la souche 8505C et la souche traitée *sibag3* en analyse SILAC classique sans marquage différentiel des cystéines et sans fractionnement subcellulaire. Cette étude a été réalisée dans notre laboratoire et les protéines ont été confirmées par Western Blot à l'Istituto Nazionale Tumori (données en cours de publication). Ces protéines sont indiquées dans le Tableau 12 et le Tableau 13 (§) et confirment que la méthode fournit des données quantitatives fiables de profil d'expression des protéines.

L'analyse par la stratégie OcSILAC adaptée au fractionnement subcellulaires a permis également d'identifier un nombre de protéines non observées dans l'analyse SILAC classique effectuée sur les deux souches étudiées (152 protéines). Ceci provient non

seulement du fractionnement subcellulaire qui étend la couverture du protéome aux protéines membranaires, nucléaires, etc. mais également grâce à l'enrichissement sélectif des cystéines oxydées qui permet d'augmenter la gamme dynamique. Parmi les protéines identifiées uniquement dans la stratégie adaptée au fractionnement subcellulaire, 19 protéines figurent parmi les protéines dont le profil d'expression varie d'une manière significative. Ces protéines sont indiquées dans le Tableau 12 et le Tableau 13 (*).

Parmi les protéines surexprimées, nous trouvons la Heat shock protein beta-1 ou Hsp27. L'Hsp27 fait partie de la famille des petites Hsp. Elle interagit avec l'Hsp70 et facilite le transfert des protéines clientes à l'Hsp70 [175]. L'Hsp27 interagit également avec BAG3 [176]. L'Hsp27 joue aussi un rôle de régulation négative de l'apoptose et se trouve surexprimée dans différents types de cancer (prostate, pancréas) [177]. Les cellules cancéreuses possèdent souvent plusieurs oncogènes et un degré élevé de redondance de signal, ce qui affaiblit l'efficacité des traitements anticancéreux simples [178]. L'Hsp27 fait partie des protéines qui participent à la résistance des cellules cancéreuses au traitement [179]. La surexpression de l'Hsp27 pourrait ainsi être une forme de résistance au traitement *sibag3* soulignant l'importance des multitraitements.

D'autre part, les résultats de l'analyse montrent un niveau d'expression moins important pour la thiorédoxine chez les cellules traitées. La thiorédoxine est souvent surexprimée dans plusieurs cancers et joue un rôle dans la résistance au traitement en bloquant l'apoptose des cellules cancéreuses [180]. L'expression de la thiorédoxine est promue par le facteur de transcription Nrf2 (se liant aux éléments de réponse ARE, voir partie §I.4.2.1) suite à une augmentation de la concentration de ROS. La baisse du niveau d'expression de la thiorédoxine chez les cellules *sibag3* pourrait suggérer une baisse du stress oxydatif suite au traitement. D'autre part, il a été suggéré également que l'expression de la thiorédoxine pourrait être modulée par la voie NF- κ B [181], [182]. Une baisse de l'activation de cette voie suite au traitement *sibag3* expliquerait également la baisse du niveau d'expression de la thiorédoxine.

IV.2.2.2 Statut redox des cystéines

Du côté de la caractérisation des cystéines, l'analyse a permis de détecter plus de 1400 séquences peptidiques contenant plus de 1500 cystéines identifiées dans différents états redox dans 655 protéines. Quant à l'information du statut redox, plus de 750 cystéines ont été identifiées comme oxydées et plus de 850 comme réduites. Parmi ces cystéines, l'information redox de plus de 800 résidus a pu être corrigée (normalisée) par

l'information du niveau d'expression de la protéine. L'exploitation des données relatives aux niveaux d'oxydation des cystéines a été effectuée avec le logiciel Perseus de la même manière que pour les protéines, en appliquant le test de significativité *Significance A* aux rapports r_{ox} et r_{re} (respectivement les ratios des formes oxydées et réduites dans la souche 8505C/la souche *sibag3*) normalisés par l'information du profil d'expression. Les cystéines avec une valeur- $p < 0,05$ représentent donc des cystéines dont la fraction réduite ou oxydée dans la protéine change d'une manière significative suite au traitement.

Nous distinguerons donc les fractions oxydées qui augmentent, les fractions oxydées qui diminuent, les fractions réduites qui augmentent et les fractions réduites qui diminuent toutes d'une manière significative. Ces données sont présentées aux Tableau 14, Tableau 15, Tableau 16 et Tableau 17, respectivement.

Tableau 14 - Liste des séquences peptidiques contenant des cystéines dont la fraction oxydée (r_{ox} normalisé) augmente

Protéine	Identifiant UniProt	Séquence	r_{ox}	Fraction	Valeur-p
<i>Scaffold attachment factor B1;Scaffold attachment factor B2</i>	A0AV56;Q14151	KFDFDACNEVPPAPK	0.45	NEB	1.9E-02
<i>Coronin</i>	A7MAP1	SIKDTICNQDER	0.47	NEB	2.5E-02
<i>Elongation factor 1-gamma</i>	B4DTG2	KAAAPAPEEEMDECEQALAAEPK	0.38	NEB	5.0E-03
<i>Lamin-A/C;Prelamin-A/C</i>	P02545	SVTVVEDDEDEDGDDLLHHHHGSHCSSSGDPAEYNLR	0.45	NEB	1.7E-02
		AQNTWGCNLSLR	0.51	NEB	4.4E-02
<i>Kaliocin-1;Lactoferricin-H;Lactoferricin-A;Lactoferricin-B;Lactoferricin-C;Lactotransferrin</i>	P02788	NLLFNDNTECLAR	0.11	NEB	1.5E-09
<i>Integrin beta-1</i>	P05556	KGCPPDDIENPR	0.57	MEB	4.2E-02
<i>Filamin-A</i>	P21333	ATCAPQHGA PGPGPADASK	0.55	MEB	3.6E-02
			0.45	NEB	1.8E-02
<i>Calreticulin</i>	P27797	LFPNSLDQTD MHGDSEYNIMFGPDICGPGTK	0.69	CEB	1.1E-02
<i>14-3-3 protein sigma</i>	P31947	GAVEKGEE LSCEER	0.42	MEB	5.0E-03
<i>MAP1 light chain LC1;MAP1B heavy chain;Microtubule-associated protein 1B</i>	P46821	TPDTSTYCYETA EK	0.50	NEB	3.7E-02
<i>MAP1 light chain LC1;MAP1B heavy chain;Microtubule-associated protein 1B</i>	P46821	TPQASTYSYETSDLCYTAEKK	0.51	NEB	4.2E-02
<i>Elongation factor Tu, mitochondrial</i>	P49411	HYAHTDCPGHADYVK	0.56	MEB	4.1E-02
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed</i>	P62937	GFGYKGSCFHR	0.47	MEB	1.1E-02

<i>Tropomyosin alpha-4 chain</i>	P67936	LAQAKEENVGLHQ'TLDQ'TLNELNCI	0.43	CEB	3.1E-07
			0.57	MEB	4.3E-02
<i>Tubulin alpha-1B chain;Tubulin alpha-4A chain</i>	P68366;P68363	AYHEQLSVAEITNACFEPANQMVK	0.27	CEB	2.3E-14
			0.56	MEB	4.1E-02
			0.50	NEB	3.7E-02
		SIQFVDWCPTGFK	0.46	MEB	9.4E-03
			0.43	NEB	1.3E-02
<i>Tubulin beta-4A chain;Tubulin beta-4B chain</i>	P68371;P04350	EIVHLQAGQCGNQIGAK	0.33	CEB	5.9E-11
			0.54	MEB	3.3E-02
			0.47	NEB	2.5E-02
<i>Peroxisredoxin-4</i>	Q13162	TREEECHFYAGGQVYPGEASR	0.76	CEB	4.5E-02
		LVQAFQYTDKHGEVCPAGWKPGSETIIPDPAGK	0.51	NEB	4.2E-02
<i>Poly(rC)-binding protein 1;Poly(rC)-binding protein 2</i>	Q15365;Q15366-2	INISEGNCPER	0.43	NEB	1.3E-02
<i>Apoptotic cbromatin condensation inducer in the nucleus</i>	Q9UKV3	KCEAEEAEPPAATQPQTSETQTSHLPESER	0.37	NEB	4.4E-03

Tableau 15 - Liste des séquences peptidiques contenant des cystéines dont la fraction oxydée (r_{ox} normalisé) diminue

<i>Protéine</i>	<i>Identifiant UniProt</i>	<i>Séquence</i>	r_{ox}	<i>Fraction</i>	<i>Valeur-p</i>
<i>Integrin alpha-6 heavy chain</i>	J3KN41	FGSCQQGVAATFTK	1.85	MEB	8.3E-03
		VVTCAHRYEK	1.95	MEB	3.2E-03

<i>Alpha-actinin-1;Alpha-actinin-3;Alpha-actinin-4</i>	O43707;Q08043;P12814	TFTAWCNSHLR	1.50	NEB	4.8E-02
<i>22 kDa interstitial collagenase;27 kDa interstitial collagenase;Interstitial collagenase</i>	P03956	ANSWFNCR	1.54	NEB	2.8E-02
<i>Catalase</i>	P04040	LVNANGEAVYCK	2.41	MEB	2.3E-05
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>	P09651	SHFEQWGTLTDCVVMR	1.68	MEB	4.2E-02
<i>Peroxisredoxin-2</i>	P32119	KLGCCEVLGVSVDSQFTHLAWINTPR	1.64	NEB	9.3E-03
<i>Triosephosphate isomerase</i>	P60174	DCGATWVVLGHSER	1.67	NEB	6.3E-03
		VAHALAEGLGVACIGEKLDER	1.687	NEB	5.1E-03
<i>Lysozyme C</i>	P61626	TPGAVNACHLSCSALLQDNIADAVACAK	5.00	NEB	2.7E-25
<i>Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1</i>	Q01082	SLLDACESR	1.63	NEB	1.1E-02
<i>Reticulon-4</i>	Q9NQC3-2	YSNSALGHVNCTIK	2.21	MEB	2.1E-04

Tableau 16 - Liste des séquences peptidiques contenant des cystéines dont la fraction réduite (r_{re} normalisé) augmente

<i>Protéine</i>	<i>Identifiant UniProt</i>	<i>Séquence</i>	<i>r_{re}</i>	<i>Fraction</i>	<i>Valeur-p</i>
<i>Cofilin-1</i>	E9PK25	KAVLFCLSEDKK	0.59	MEB	1.9E-03
			0.35	NEB	8.6E-07
		LTGIKHELQANCYEEVKDR	0.36	MEB	6.0E-09
<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17, Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5</i>	H3BLZ8;J3KTA4	GDGPICLVLPATR	0.65	CEB	2.2E-02
			0.68	CEB	4.5E-02
		GVEICIA TPGR	0.68	MEB	2.0E-02

<i>60S ribosomal protein L18</i>	J3QQ67	ILTFDQLALDSPKGGCTVLLSGPR	0.63	CEB	1.6E-02
			0.69	MEB	2.5E-02
<i>22 kDa interstitial collagenase;27 kDa interstitial collagenase;Interstitial collagenase</i>	P03956	CGVPDVAQFVLTEGNPR	0.56	NEB	6.0E-03
<i>Catalase</i>	P04040	LGPNYLHIPVNCYPYR	0.69	MEB	3.0E-02
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	P04406	VPTANVSVDLTCR	0.19	MEB	1.7E-20
<i>Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2</i>	P04899-4	QLFALSCTAEEQGVLDDLSGVIR	0.71	MEB	4.1E-02
<i>Integrin beta-1</i>	P05556	DKLPQPVPDPVSHCKEK	0.57	MEB	9.0E-04
<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	P07900-2	HGLEVIYMIPIDEYCVQQLK	0.56	CEB	2.4E-03
<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>	P08107	ELEQVCNPIISGLYQGAGGPGPGGFGAQGPK	0.59	CEB	6.3E-03
<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	P12004	DLSHIGDAVVISCAK	0.56	CEB	2.7E-03
<i>40S ribosomal protein S12</i>	P25398	KVVGCSGVVVK	0.63	MEB	6.2E-03
<i>Calreticulin</i>	P27797	CKDDEFTHLYTLIVRPDNTYEYVK	0.69	MEB	2.7E-02
<i>Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial</i>	P30048	AFQYVETHGEVCPANWTPDSPTIKPSAASK	0.62	NEB	2.3E-02
<i>Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial</i>	P33316	IAQLICER	0.64	CEB	1.8E-02
<i>Transaldolase</i>	P37837	ALAGCDFLTISPK	0.68	CEB	4.0E-02
<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	P40926	GYLGPQLPDCLKGCDVVVIPAGVPR	0.59	NEB	1.3E-02
<i>MAP1 light chain LC1;MAP1B heavy chain;Microtubule-associated protein 1B</i>	P46821	TATCHSSSPPIDAASAEPYGFR	0.62	NEB	2.4E-02
<i>T-complex protein 1 subunit gamma</i>	P49368	TLIQNCGASTIR	0.32	CEB	5.2E-09
			0.66	MEB	1.4E-02

<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	P55072	LGDVISIQPCPDVK	0.72	MEB	4.8E-02
			0.66	NEB	4.7E-02
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>	Q00839	AVVVCPKDEDYKQR	0.61	CEB	1.0E-02
<i>Fatty acid-binding protein, epidermal</i>	Q01469	TTQFSC TLGEKFEET TADGR	0.47	CEB	8.5E-05
<i>Peroxiredoxin-4</i>	Q13162	LVQAFQYTDKHGEVCPAGWKPGSETIIPDPAGK	0.63	MEB	6.6E-03
		TREEECHFYAGGQVYPGEASR	0.65	NEB	3.9E-02
<i>Scaffold attachment factor B2</i>	Q14151	LQLECQR	0.41	NEB	3.4E-05
<i>Ribosome biogenesis regulatory protein homolog</i>	Q15050	CAGPTPEAELQALAR	0.51	NEB	1.6E-03
<i>Non-POU domain-containing octamer-binding protein</i>	Q15233	CSEGSFLLTTFPRPV TVEPMDQLDDEEGLPEK	0.61	NEB	1.8E-02
<i>Poly(rC)-binding protein 1</i>	Q15365	AITTAGVPQSVTECVK	0.61	NEB	2.0E-02
<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	Q16555	GLYDGPVCEVSVTPK	0.58	CEB	4.6E-03
			0.70	MEB	3.3E-02
<i>Translationally-controlled tumor protein</i>	Q5W0H4	IREIADGLCLEVEGK	0.46	CEB	5.9E-05
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1</i>	Q9BUJ2	AEPYCSVLPGFTFIQHLPLSER	0.51	NEB	1.5E-03

Tableau 17 - Liste des séquences peptidiques contenant des cystéines dont la fraction réduite (r_n normalisé) diminue.

<i>Protéine</i>	<i>Identifiant UniProt</i>	<i>Séquence</i>	<i>rre</i>	<i>Fraction</i>	<i>Valeur-p</i>
<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1</i>	F5H3A1	LIIVEGCQR	1.50	NEB	2.7E-02
–	F8VQ10	NCPHIVVGTPGR	1.37	CEB	4.3E-02

<i>60S ribosomal protein L32</i>	F8W727	SYCAEIAHNVSSK	1.68	MEB	7.9E-03
<i>Stress-induced-phosphoprotein 1</i>	G3XAD8	ALDLSSCKEAADGYQR	3.15	NEB	5.7E-11
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	G8JLB6	YGDGGSTFQSTTGHCVHMR	1.47	CEB	1.2E-02
<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	O00299	LHIVQVVCK	1.66	CEB	8.7E-04
<i>Alpha-actinin-1;Alpha-actinin-3;Alpha-actinin-4</i>	O43707;Q08043;P12814	KTFTAWCNSHLR	1.79	MEB	2.7E-03
<i>Splicing factor 3B subunit 1</i>	O75533	VQENCIDLVR	2.16	NEB	1.5E-05
<i>22 kDa interstitial collagenase;27 kDa interstitial collagenase;Interstitial collagenase</i>	P03956	ANSWFNCR	1.52	NEB	2.2E-02
<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1</i>	P04843	LKTEGSDLCDR	1.68	MEB	7.9E-03
<i>ADP/ATP translocase 2;ADP/ATP translocase 2, N-terminally processed;ADP/ATP translocase 3</i>	P05141;P12236	EFRGLGDCLVK	1.71	MEB	6.1E-03
<i>Profilin-1</i>	P07737	CYEMASHLR	1.41	CEB	2.6E-02
<i>Adenine phosphoribosyltransferase</i>	P07741	GFLFGPSLAQELGLGCVLIR	1.46	CEB	1.3E-02
<i>Heat shock protein HSP 90-α</i>	P07900-2	KTKFENLCK	1.37	CEB	4.0E-02
<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	P10809	AAVEEGIVLGGGCALLR	1.38	CEB	3.8E-02
<i>Annexin A3</i>	P12429	AGENRWGTDEDKFTEILCLR	1.39	CEB	3.2E-02
<i>Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3</i>	P22102	SGCKVDLGGFAGLFDLK	1.38	CEB	3.6E-02
<i>60S ribosomal protein L10</i>	P27635	SCGKDGPHIR	1.86	CEB	4.4E-05
<i>Nicotinamide phosphoribosyltransferase</i>	P43490	DLNCSFK	1.39	CEB	3.4E-02

<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</i>	P52272	KACQIFVR	2.64	MEB	3.1E-07
			1.58	NEB	1.2E-02
<i>Adenylate kinase 2, mitochondrial; Adenylate kinase 2, mitochondrial, N-terminally processed</i>	P54819-2	LAENFCVCHLATGDMLR	1.46	NEB	4.0E-02
<i>Cell division control protein 42 homolog</i>	P60953	YVECSALTQK	1.38	CEB	3.7E-02
<i>40S ribosomal protein S3a</i>	P61247	LFCVGFTK	1.63	MEB	1.2E-02
<i>60S ribosomal protein L11</i>	P62913	KLCLNICVGESGDRLTR	1.81	CEB	1.0E-04
<i>40S ribosomal protein S21</i>	P63220	TYAICGAIRR	2.31	CEB	3.3E-08
<i>Tubulin alpha-1B chain; Tubulin alpha-4A chain</i>	P68366;P68363	HGKYMACCLLYR	1.48	NEB	3.4E-02
		AVCMLSNTTAIAEAWAR	1.45	NEB	4.3E-02
<i>Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK</i>	Q09666	EVFSSCSSEVVLSGDDEEYQR	1.54	NEB	1.8E-02
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2</i>	Q13200	SGALLACGIVNSGVR	1.46	CEB	1.4E-02
<i>Neutral alpha-glucosidase AB</i>	Q14697	SNFKTCEESSFCKR	1.56	MEB	2.5E-02
		TCEESSFCKR	1.47	NEB	3.6E-02
<i>Plectin</i>	Q15149-4	LCFEGLR	2.65	MEB	2.8E-07
			1.46	NEB	3.9E-02

<i>Poly(rC)-binding protein 2</i>	Q15366-2	ATTIAGIPQSIIECVK	1.42	CEB	2.2E-02
<i>Leucine-rich repeat-containing protein 59</i>	Q96AG4	ATILDLSCK	1.86	NEB	5.3E-04

D'après ces tableaux, nous constatons donc une augmentation de la fraction oxydée de 22 cystéines, une baisse de la fraction oxydée de 14 cystéines, une augmentation de la fraction réduite de 35 cystéines et une baisse de la fraction réduite de 37 cystéines.

Parmi les cystéines identifiées, nous trouvons les cystéines C39 (fractions MEB et NEB) et C139 (fraction MEB) de la cofiline parmi les cystéines dont la fraction réduite augmente. Les cellules cancéreuses sont des cellules caractérisées par une perte du comportement normal d'une cellule notamment au niveau de la prolifération et de la survie. Ce dysfonctionnement est accompagné de l'acquisition de caractéristiques invasives et migratoires anormales. L'actine et la tubuline forment des polymères versatiles et dynamiques qui sont impliqués dans l'organisation du cytoplasme, la détermination de la polarité cellulaire et la séparation des chromosomes durant la division cellulaire. Ces aspects sont fortement perturbés chez les cellules cancéreuses [183]. La cofiline joue de son côté un rôle de régulation (polymérisation et dépolymérisation) de l'actine. Cette protéine est non seulement régulée par la phosphorylation/déphosphorylation de certains de ses résidus sérines, mais elle est également sous un contrôle redox, par le biais de quatre résidus cystéines [184]. La forme oxydée de la cofiline est inactive, alors que la forme réduite est active. La cystéine C39 montre une augmentation de la fraction réduite. L'observation du résultat d'analyse obtenu pour de la fraction oxydée de la même cystéine ne montre pas de changement significatif, mais permet de calculer le changement du pourcentage de la fraction oxydée (selon les équations établies dans la partie §III.5.3) qui passe de 70% à 50% chez les cellules traitées *sibag3*. La cystéine C139 montre également une augmentation de la fraction réduite. Le test de différence de moyennes entre r et r_{re} montre cependant que $r \approx r_{re}$ ce qui permet d'estimer que la cystéine est entièrement réduite avec un faible changement de la fraction oxydée (cas de figure 3 établi dans la partie III.5.3). Ces deux exemples illustrent l'importance d'étudier les deux fractions oxydée et réduite simultanément ainsi que le niveau d'expression lorsque ces informations sont disponibles afin d'obtenir une image complète et fine des changements redox sur les résidus cystéines. Ces résultats pointent également dans la direction d'un changement dans l'organisation du cytosquelette suite au traitement *sibag3* à travers l'activité de la cofiline. Des résidus cystéines d'autres protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette figurent également dans les listes des protéines ayant subi un changement redox. La tropomyosine a déjà été décrite comme une protéine dont l'activité est affectée par le changement du statut redox de ses résidus cystéines [185]. Si cette étude ne précisait pas le ou les résidus

concernés, l'analyse OcSILAC identifie finement une augmentation de la fraction oxydée de la cystéine C247.

Outre les protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette, un nombre de chaperons moléculaires figurent dans les listes de protéines dont les résidus cystéines subissent des changements redox. Notamment les Hsp70 citées précédemment (et dont l'activité est inhibée par BAG3), mais également les Hsp90, l'autre machinerie de repliement des protéines étudiée pour son implication dans plusieurs cancers [186]. L'analyse monte une augmentation de la fraction réduite de la cystéine C603 de l'Hsp70 1A, alors que l'Hsp90 α présente l'augmentation de la fraction réduite d'une cystéine (C529) et la diminution de la fraction réduite d'une autre (C572). La régulation redox de l'Hsp90 a déjà été proposée, à travers la nitrosylation de son résidu cystéine C597 (non observé dans notre analyse) [187]. Nous observons également une augmentation de la fraction réduite de la protéine *Stress-induced-phosphoprotein 1* ou Hop. La protéine Hop joue le rôle de co-chaperon et permet l'association des Hsp70 et Hsp90 pour former le complexe Hsp70-Hop-Hsp90. Comme d'autres chaperons et co-chaperons moléculaires, Hop est impliquée dans plusieurs cancers où elle peut souvent être surexprimée, comme le cas du cancer du pancréas [188]. Ces résultats impliquant ces deux familles de protéines, ainsi que les partenaires qui régissent leurs fonctions, pourraient suggérer une régulation redox par le biais de différents résidus cystéines.

IV.3 Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre deux applications de la stratégie OcSILAC. Ces deux applications ont permis de mettre en évidence les atouts de l'approche. Nous nous sommes également rendu compte de certaines de ses limitations et des défis qui peuvent se poser. Comme conclusion de cette partie du travail, marquons quelques messages importants à retenir:

- i) Intérêt de l'enrichissement : l'étape d'enrichissement des cystéines oxydées par l'approche *biotin switch* permet d'accéder aux formes les moins abondantes et d'étendre la couverture du redoxome. Cette étape est particulièrement importante compte tenu de la technique de détection. L'enrichissement élargit la gamme dynamique accessible en spectrométrie de masse. L'élargissement de la gamme dynamique est aussi obtenu grâce au fractionnement subcellulaire.
- ii) Intérêt de la normalisation par le niveau d'expression de la protéine : ceci est vrai pour toutes les méthodes de quantification des modifications post-

traductionnelles afin de discriminer un changement de la fraction modifiée d'un site d'une simple modulation du niveau d'expression de la protéine.

- iii) Intérêt de la détection simultanée de la forme oxydée et de la forme réduite : nous avons vu que même en ayant l'information du niveau d'expression de la protéine, l'information quantitative du peptide non oxydé est essentielle. L'importance de chacune des informations générées par la stratégie OcSILAC nous a permis de formuler trois conditions nécessaires pour conclure quant à un évènement redox en fonction de la fiabilité de l'information générée.
- iv) Intérêt de la préparation simultanée des échantillons comparés : les échantillons subissent toutes les étapes de préparation dans le même tube minimisant ainsi les phénomènes d'oxydation non spécifique affectant un seul des deux échantillons.
- v) Le coût de la méthode : les réactifs SILAC nous ont permis d'effectuer plusieurs cultures cellulaires avec un coût raisonnable. Le marquage métabolique a été le seul marquage nécessaire pour obtenir l'ensemble des informations quantitatives, aucun recours à un marquage additionnel n'a été nécessaire.

Il existe aussi un certain nombre de limitations. Nous avons évoqué les difficultés d'évaluation des données quantitatives dans les cas de variations importantes d'expression et l'absence totale d'un des deux partenaires lourd et léger. Ces données sont générées avec une variance importante et nécessitent souvent un traitement manuel.

La limitation majeure du marquage métabolique réside cependant dans son d'application. En effet, s'il est possible de marquer des cellules auxotrophes (et dans certains cas des cellules prototrophes) ce ceci n'est pas possible pour les tissus et organes dans le cadre d'études menées sur l'organisme humain. Quelles sont les alternatives que nous pouvons explorer? Le marquage chimique peut-il être proposé comme solution adéquate pour obtenir le même type d'information obtenue avec OcSILAC? Quelles limitations et défis trouverons nous avec ce nouveau type de marquage? Nous essayerons de répondre à ces différentes questions dans le chapitre suivant.

Chapitre V : OxiTMT, une stratégie analytique redox basée sur un marquage chimique

V.1 Introduction

Le développement, mise au point et applications de la stratégie OcSILAC et de son extension par le fractionnement subcellulaire représentent une partie majeure du travail effectué pendant ce projet de thèse. La méthodologie développée concernait aussi bien la préparation de l'échantillon que le traitement des données générées. Malgré les atouts présentés par OcSILAC, elle présente également certaines limitations évoquées dans le chapitre précédent. Une de ces limitations étant l'impossibilité de marquer des tissus (humains) par des acides aminés avec des isotopes lourds. Ainsi, dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à explorer d'autres types de marquage, à savoir le marquage chimique. Le développement récent de marqueurs isobariques TMT spécifiques de la cystéine iodoTMT [142] ouvre la porte au développement de méthodes redox qui emploient ce type de réactif disponible en 6 versions (6plex). Dans la suite de ce chapitre nous présenterons le concept de la méthode développée, nommée OxiTMT, sa mise au point et son application à une étude de culture d'*Escherichia coli* soumise à un traitement par du peroxyde d'hydrogène. Cette première application de la méthode OxiTMT est le sujet d'un article en cours de soumission qui sera présenté dans ce chapitre.

V.2 OxiTMT : le concept

Le concept de la stratégie OxiTMT se base sur le marquage des cystéines oxydées dans un échantillon par un premier réactif iodoTMT alors que le contenu total en cystéine du même échantillon est marqué par un deuxième réactif iodoTMT. Le marquage chimique iodoTMT étant disponible en 6 versions, ceci ouvre la possibilité à la comparaison de 3 échantillons en même temps. En pratique, ceci s'effectue en divisant chaque échantillon en deux. La première partie de l'échantillon est soumise d'abord à un traitement à l'iodoacétamide afin de bloquer les thiols libres. L'excès d'iodoacétamide est éliminé par précipitation et l'échantillon est repris dans un tampon contenant un agent réducteur (DTT) pour réduire les thiols oxydés. Après l'élimination de l'excès de DTT, l'échantillon est repris dans un tampon contenant un premier réactif iodoTMT pour marquer les cystéines oxydées dans cette partie de l'échantillon. En parallèle, la deuxième partie de l'échantillon subit un traitement différent qui omet l'étape d'alkylation à l'iodoacétamide. Cette partie de l'échantillon est réduite entièrement au DTT. Après l'élimination du DTT, le contenu total en cystéine est marqué par un deuxième réactif

iodoTMT. Ce traitement est effectué de la même manière pour les autres échantillons étudiés, en utilisant à chaque fois un réactif iodoTMT différent. Des quantités équimolaires des fractions des différents échantillons sont ensuite réunies. Les réactifs TMT offrent la possibilité d'enrichissement des peptides marqués par immuno-affinité. Les fractions enrichie et non retenue sont analysées toutes les 2 en LC-MS. Le concept de la stratégie OxiTMT est résumé dans la Figure 46.

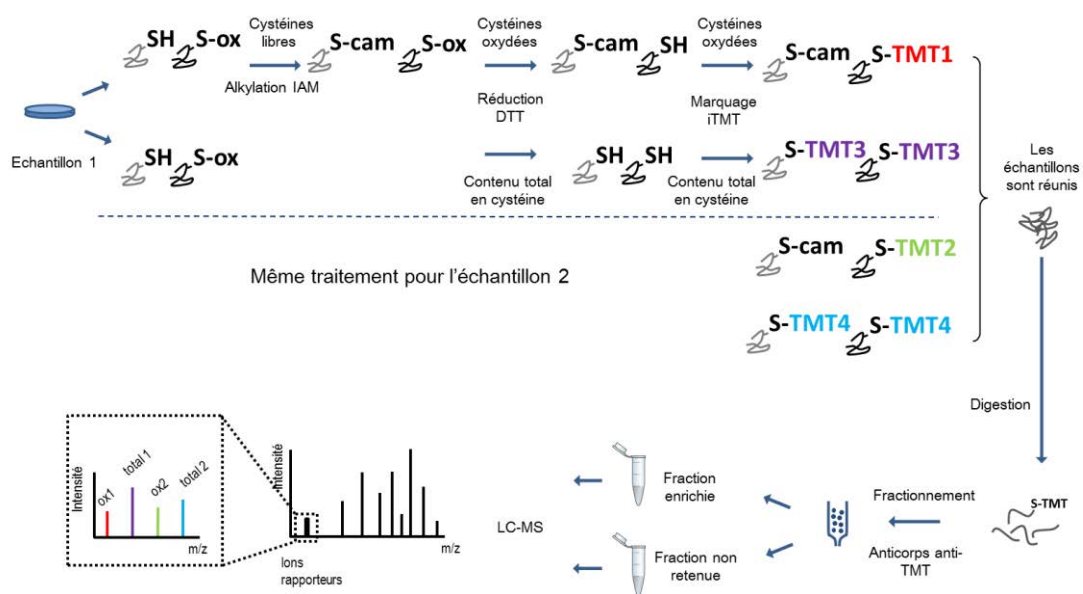


Figure 46 - Représentation schématique du protocole expérimental de la stratégie OxiTMT. Dans ce cas deux échantillons sont comparés.

V.3 La mise au point du protocole OxiTMT

Comme dans le cas de la stratégie OcSILAC, les différentes étapes du protocole sont soumises à des tests de validation. Les tests de validation ont été appliqués à des extraits de protéome de cellules HeLa. L'efficacité du blocage des cystéines libres ne sera pas présentée pour éviter la redondance avec la mise au point du protocole OcSILAC (voir partie §III.3.4 page 108). Nous gardons les conditions d'alkylation adoptées pour la stratégie OcSILAC (600 μ L d'iodoacétamide à une concentration de 200 mM pour 300 μ g de protéines). L'étape suivante consiste à vérifier l'efficacité du marquage des cystéines réduites par DTT par le réactif iodoTMT. Ainsi, des tests sont effectués sur 100 μ g d'extrait de cellules HeLa. Les extraits sont réduits par ajout de DTT (20 mM, 37 °C pendant 2 heures). L'excès de DTT est éliminé par précipitation acide au TCA 20% et les extraits sont resuspendus dans 100 μ L du tampon de lyse (6 M urée, 1X inhibiteur de protéase, 1% octyl- β -glucopyranoside, 150 mM Tris pH 8,8) contenant la totalité d'un tube de réactif iodoTMT (soit 0,2 mg, soit $4,37 \cdot 10^{-7}$ mol). La réaction se déroule à 37 °C dans le noir pendant une heure. Un extrait qui sert de

témoin ne subit pas la réaction d'alkylation à l'iodoTMT. A la fin de la réaction d'alkylation, 2 μL (à une concentration de 10 mM) de fluorophore maléimide spécifique des thiols (Dylight 550) sont ajoutés à chaque extrait. Environ 15 μg de chaque extrait sont chargés et séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12,5%. Les gels sont ensuite examinés en fluorescence (Figure 47).

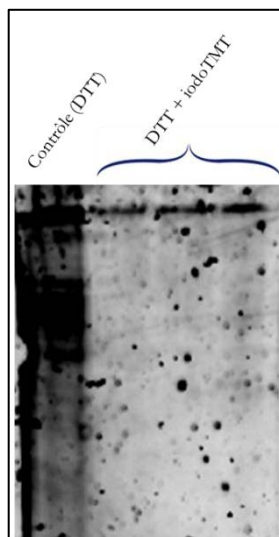


Figure 47 - Séparation SDS-PAGE d'extraits de cellules HeLa pour vérifier l'efficacité de l'alkylation à l'iodoTMT. La condition à gauche représente le contrôle n'ayant pas subi le marquage à l'iodoTMT. (accumulation pendant 30 s).

L'observation du gel ne montre pas de fluorescence provenant des extraits alkylés à l'iodoTMT. Le contrôle confirme la présence de fluorescence lorsque l'extrait contient des thiols libres. Les instructions du fournisseur préconisent l'utilisation d'un excès de 10 fois du réactif iodoTMT par rapport au contenu en cystéines. Dans nos conditions, soit 100 μg d'extrait de protéines (soit $1,6 \cdot 10^{-8}$ mol de cystéines libres, pour un poids moléculaire moyen de 60000 Da et 10 cystéines libres par protéine) et un tube entier du réactif iodoTMT (soit $4,37 \cdot 10^{-7}$ mol) nous nous trouvons à un excès de 26 fois du réactif iodoTMT. Ces conditions sont suffisantes pour obtenir une alkylation totale des cystéines réduites.

V.4 Application du concept OxiTMT à l'étude d'une culture d'*Escherichia coli* traitée par un agent oxydant : article en cours de soumission

OxiTMT: quantitative analysis of the cysteine redoxome by iodoacetyl tandem mass tags.

Shakir Shakir, Giovanni Chiappetta, and Joelle Vinh

ESPCI ParisTech, Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique (SMBP), USR3149 CNRS, Paris, France.

Abstract

The local redox conditions that reign inside a cell have a determining effect on a number of biological processes. These conditions are often set by Reactive Oxygen Species (ROS) and/or Reactive Nitrogen Species (RNS). Members of the ROS and RNS families have been linked to a number of pathologies but have also been shown to play a key regulating role in cell signaling events. ROS and RNS have a number of targets that range from small molecules to lipids, proteins and DNA. On the proteome level, thiol groups of cysteinyl side chains constitute the major target. Posttranslational modifications on these residues include reversible changes such as S-nitrosylation, sulfenylation and the formation of disulfide bridges. A number of analytical techniques based on mass spectrometry have been developed to characterize the cysteine redoxome, often facing a number of technical challenges, mostly related to the lability and heterogeneity of the oxidized forms. Oxidized cysteines constitute a minority on the proteome level meaning that an enrichment step is needed to increase the dynamic range to reach the less abundant forms. Furthermore, any PTM quantification method needs to take the parent protein's expression level into account. While taking all these limitations into consideration, we have developed a quantitative analytical strategy named OxiTMT, based on chemical labeling with iodoacetyl isobaric tandem mass tags. This study serves as a proof of concept of the established

protocol and consequent data treatment step. It opens the ways towards the study of tissues and sera.

I. Introduction

The accumulation of reactive oxygen species (ROS) in cells is regarded as a toxic event having a direct impact on a number of biomolecules. This event, referred to as oxidative stress, has been tied to aging and a variety of pathologies. Targets of ROS include DNA and lipids. However, proteins represent by far the largest fraction of affected family of molecules, with estimates placing that fraction as high as 70% [1]. At the proteome level, the presence of an increased amount of ROS leads to a number of posttranslational modifications (PTMs). Most notably, the oxidation of cysteine (Cys) residues leads to the formation of sulfenic acids (-S-OH), S-nitro groups (S-NO) and disulfides bridges, the latter known as oxidative folding [2]. With the discovery of cellular pathways using “cysteine switches” to mediate signal transduction in an analogous to phosphorylation, the way we view ROS has shifted from purely toxic compounds to important second messengers.

These general conclusions have led to the development of analytical techniques in proteomics aiming to exhaustively characterize and quantify PTMs on Cys residues. Redox proteomics remain a technical challenge due to the labile nature of thiol-redox reactions. Furthermore, compared to other PTMs, the number of modified residues per protein can be high. The low abundance of oxidized proteins, combined to the intrinsic heterogeneity of the oxidized forms is another source of complexity. To date, the most efficient redox proteomics approach relies on differential labeling of cysteines according to their redox status and the subsequent identification of modified residues by a variety of techniques such as fluorescence or mass spectrometry. Efforts have also been made to go beyond identification in an aim to quantify the changes on a given residue. Among these strategies, OxICAT relies on heavy and light ICAT reagents as the

two different alkylating agents to obtain a good estimation of the percentages of oxidized and reduced forms [3]. Our group has developed a strategy named OcSILAC allowing the quantification of changes on a specific Cys residue normalized relative to the expression profile of the protein it is part of. OcSILAC associates a SILAC strategy to an approach of differential trapping of thiols (Profiling the cysteine redox proteome by Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture - Proceedings of the 7th EuPA Meeting, St. Malo, France, Oct. 2013). While this method seems adapted to the quantification of redox changes in proteins in cell cultures, the employment of isotope labeling limits its application when considering proteomics studies applied to tissue and organ biopsies.

Recently, cysteine specific iodoacetyl isobaric tandem mass tags (iodoTMT) have been reported. IodoTMT has been employed in the study of nitrosylation and other reversible cysteine modifications in nitric oxide-protected cardiomyocyte under hypoxia [4].

Here we propose a new redox proteomics strategy, OxiTMT, based on differential thiol trapping using iodoTMT reagents and Liquid Chromatography – Mass Spectrometry analysis (LC-MS). This approach allows the quantification of cysteine redox changes in proteins in cells, tissue and organ biopsies. In this paper we applied OxiTMT to obtain a quantitative snapshot of the redox changes in *E. Coli* cells treated with 1 mM H₂O₂ by comparison to untreated cells.

II. Results

The concept of OxiTMT

Irreversible iodoacetyl Cys-specific tandem mass tags have been reported as a new sixplex isobaric labeling technique. IodoTMT reagents contain a sulfhydryl-reactive iodoacetyl group, a mass normalizing spacer arm and a mass reporter. Like with other isobaric labeling techniques, peptide quantification is based on the estimation of the relative area under the peak of the corresponding reporter ion obtained following MS/MS fragmentation.

The idea behind the OxiTMT protocol (Fig. 1) was to divide each studied sample in two, where one part would have its total cysteine content labeled with a iodoTMT reagent whereas the second part would have solely its reversibly oxidized cysteine content labeled with a second iodoTMT reagent, in this case reduced cysteines would have to be blocked first by an alkylating agent, iodoacetamide. Having the percentage of reversibly oxidized fraction for a given cysteine ($\%Ox = Oxidized/Total$), gives access to the information of the unmodified counterpart's fraction. Since iodoTMT is available as a sixplex reagent, it is possible to compare up to three conditions in a single LC-MS run.

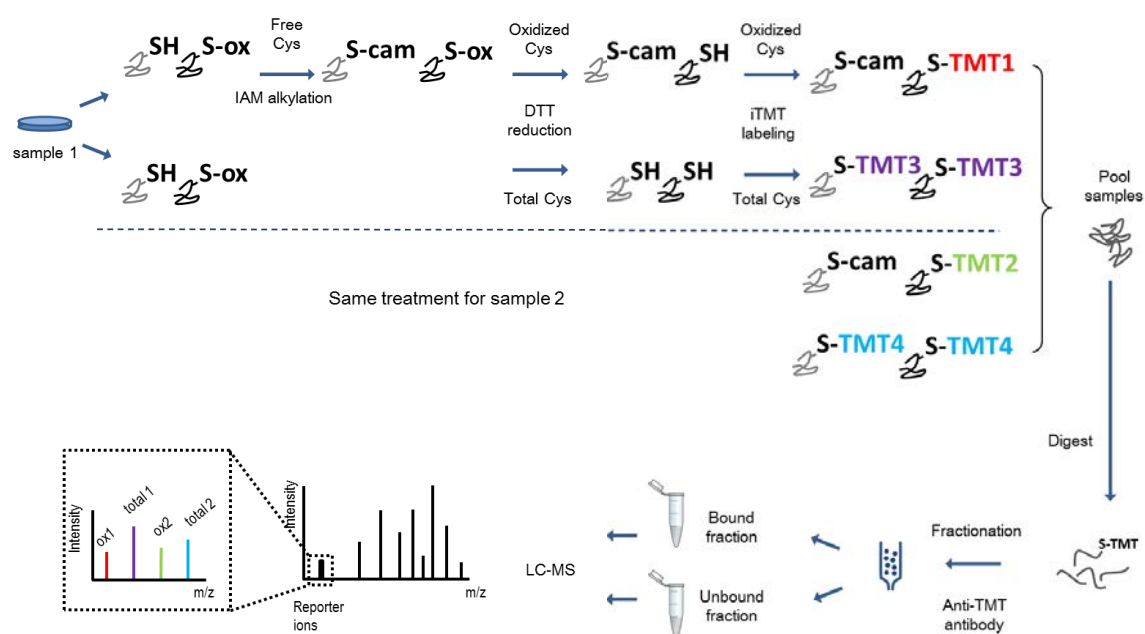


Fig. 1 Schematic representation of the OxiTMT experimental workflow. This image illustrates to the comparison of two samples. Both samples undergo the same labeling steps. In each case a portion of the sample's oxidized cysteine content is labeled with iodoTMT while the in the other protion the whole cysteine content is labeled with a different iodoTMT reagent.

Labeling efficiency

A crucial step in all redox proteomics studies is the initial step aiming to block the thiols of cysteine residues. This step is determinant to the generation of confident quantitative data. We tested a widely used blocking agent: iodoacetamide (IAM).

In order to establish the optimal conditions, three protein extracts were subjected to different IAM blocking conditions: 1. No alkylating agent, 2. 100 mM final concentration of IAM or 3. 200 mM final concentration of IAM. Reaction media were then supplemented with Dylight 550 maleimide sulfhydryl-reactive dye. Any residual free thiol from the IAM blocking step would react with the dye and be detected in the extracts by fluorescence following SDS-PAGE separation.

Results show that at 200 mM of IAM, no fluorescence is detected (Fig. 2). This concentration was adapted in our protocol for corresponding quantities of protein extracts.

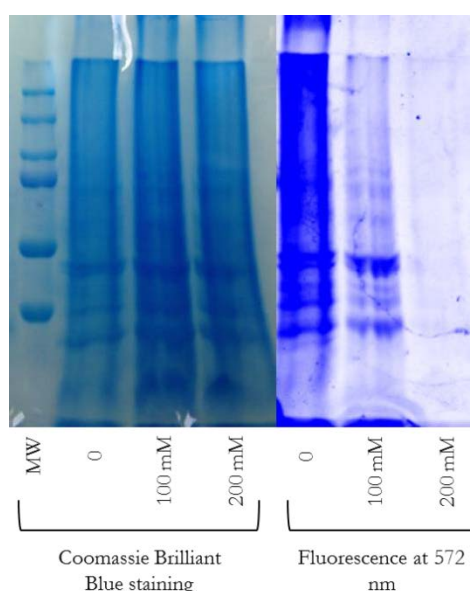


Fig 2. Labeling efficiency tested on three protein extracts. Fluorescence images were obtained by excitation at 557 nm, the emission was detected at 572 nm (30 s accumulation). Brilliant Blue staining of the gel verify the presence of proteins. The absence of fluorescence at 200 mM indicates an efficient alkylation of free thiols.

One could argue that an iodoTMT reagent could be used itself as a blocking agent for free cysteine residues while another isobaric version can be used to label reversibly oxidized cysteines upon their reduction. This would generate reporter ions for reduced and oxidized cysteines in an analogous way to the MS signal for oxidized and reduced cysteines in OxICAT. However, a test on a 100 μ g extract with the entire content of an iodoTMT vial (equivalent to a final concentration of 4mM) showed that these conditions were not sufficient to extensively block free

thiols. Using the theoretically necessary 200 mM of iodoTMT to block free thiols would be unrealistic with regards to the cost of a single experiment.

Results

To test our quantitative redox strategy, we compared *E. coli* cells treated with 1 mM H₂O₂ for 30 minutes with untreated cells. Total cysteine and oxidized cysteine fractions in each culture were labeled as explained before and the proteome extracts were analyzed by LC-MS. In order to investigate the changes in the proteome as a whole and the redox state of the treated *E. coli* cultures, the data obtained from the MaxQuant quantification results were reprocessed by Perseus. Having two sets of information, i.e. the oxidized thiol fraction and the entire thiol content, the data can be processed to yield different sets of information. The ratio of the oxidized cysteine reporter ions between two conditions (iodoTMT2/iodoTMT1 in Fig.1) reflects the change in the absolute quantity of the oxidized fraction of a given cysteine. While this information is interesting, it needs to be corrected by the proteins expression level to distinguish changes due to redox phenomena from changes due to a simple variation of the protein's expression level. To do so the percentages of the oxidized fraction of a given cysteine can be obtained by calculating the quotient of the oxidized fraction's reporter ion intensity to the total's reporter ion intensity: iodoTMT1/iodoTMT3 for sample 1 and iodoTMT2/iodoTMT4 for sample 2 in Fig.1. The ratio of oxidized cysteine percentages gives access to the change of the oxidized fraction reported to the total amount of peptide as opposed to the change in the amount of the oxidized peptide only. Finally, the ratio of the total cysteine content between two conditions (iodoTMT4/iodoTMT3 Fig.1) gives access to the change in protein expression profile, like it's the case with classic ICAT or iodoTMT quantitative experiments. In practice, to obtain these different sets of data, we calculated the ratios in each analytical replicate. The values were then averaged and the coefficient of variation (CV) determined.

All fractions were individually checked by label free LC-MS analysis to validate that equivalent overall protein content (Data not shown) were compared. No reporter ion intensity correction was deemed necessary.

Search results allowed the identification of 1229 iodoTMT labeled cysteines in total associated to 580 proteins. In the bound fraction, 886 iodoTMT labeled peptides (1019 cysteines) in 487 proteins were identified (of which 172 proteins were exclusively identified in this fraction). In the unbound fraction, 834 iodoTMT labeled peptides (893 cysteines) in 408 proteins were identified (of which 93 proteins were exclusively identified in this fraction).

IodoTMT labeled peptides represented 25% of the total identified peptides in the bound fraction (compared to 10% in the unbound fraction). We should acknowledge that the depletion kit provides imperfect fractionation even though it allows to characterize low abundance species, specifically in the bound fraction.

All identified cysteines were either carbamidomethylated or iodoTMT labeled; no unmodified cysteines were identified (with a posterior error probability < 0.05 (calculated by MaxQuant)) in either fraction, validating thus the labeling efficiency.

Only cysteine containing peptides labeled with iodoTMT with reporter quantification in at least two technical replicates were considered for quantitative data mining. Profile expression ratios were determined as described above and the values (log 2 scale) were submitted to Perseus software. Significantly changed protein expression profiles were determined using the outlier identification tool, Significance A [5], which calculated the probability (p-value) of obtaining a log-ratio of at least this magnitude under the null hypothesis that the distribution of log-ratios has normal upper and lower tails. Only outliers with at least 1.5 fold change and a p-value < 0.05 were considered. The test allowed to identify 30 significantly changed expression levels (all up-regulated) in H₂O₂ treated cells. Up-regulated proteins belonged mostly to the oxidation

reduction and generation of precursor metabolites and energy pathways (GOTERM_BP p-value of 10^{-5} and 10^{-4} respectively, calculated with DAVID Bioinformatic Tool [6]).

As for cysteine oxidation states, the percentages of the oxidized fraction in the treated cells were established as previously mentioned and then compared to the control by calculating the ratio : %Ox treated cells/%Ox control cells. Outliers were determined using the same test performed on expression profiles with the maximum p-value threshold being maintained at 0.05 and a minimum 1.5 fold change in the percentage of the oxidized fraction. We were thus able to detect a significant change in the redox state of 18 cysteine residues in the H_2O_2 treated cells. Unexpectedly, all of them showed a decrease of abundance in their oxidized fraction.

Protein names	Proteins	Gene names	Expression profile	CV (%)	Expression profile significance A (p-value)
Histidinol-phosphate aminotransferase	P06986	hisC	1.65	2.4	4.2E-02
Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	P07395	pheT	1.80	6.3	4.8E-03
Chaperone protein DnaJ	P08622	dnaJ	1.82	0.7	3.2E-03
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	P0A6H1	clpX	1.65	5.5	4.1E-02
Galactokinase	P0A6T3	galK*	1.77	9.8	7.4E-03
Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	P0A746	msrB	1.68	8.7	2.7E-02
50S ribosomal protein L31	P0A7M9	rpmE*	1.96	9.5	2.7E-04
50S ribosomal protein L36	P0A7Q6	rpmJ	1.85	4.3	2.0E-03
Serine--tRNA ligase	P0A8L1	serS	1.72	6.5	1.6E-02
DNA-directed RNA polymerase subunit beta	P0A8T7	rpoC	1.91	9.7	6.7E-04
Ferric uptake regulation protein	P0A9A9	fur*	1.91	5.8	6.6E-04
Thioredoxin reductase	P0A9P4	trxB	1.66	4.8	3.5E-02
Thioredoxin-1	P0AA25	trxA	1.64	5.5	5.0E-02
Formate dehydrogenase-O iron-sulfur subunit	P0AAJ5	fdoH	1.78	6.6	6.1E-03
Hydrogenase-2 operon protein HybA	P0AAJ8	hybA	2.28	0.7	4.6E-07
Uncharacterized protein YbeL	P0AAT9	ybeL	1.88	4.2	1.1E-03
RNA polymerase-binding transcription factor DksA	P0ABS1	dksA*	2.01	5.1	1.0E-04
Fumarate reductase iron-sulfur subunit	P0AC47	frdB*	2.05	4.8	5.2E-05
Glutaredoxin-2	P0AC59	grxB	1.84	0.3	2.4E-03
Glutaredoxin-3	P0AC62	grxC	2.10	5.9	1.8E-05
Thiol:disulfide interchange protein DsbC	P0AEG6	dsbC	1.67	0.4	3.4E-02
Thioredoxin-2	P0AGG4	trxC	1.84	6.7	2.3E-03
HTH-type transcriptional regulator IscR	P0AGK8	iscR	1.66	2.8	3.6E-02
D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatY	P0C8J6	gatY	1.78	6.2	5.8E-03
Phosphoribosylamine--glycine ligase	P15640	purD	1.68	5.4	2.7E-02
Riboflavin biosynthesis protein RibD	P25539	ribD	1.74	2.2	1.2E-02
NADH-quinone oxidoreductase subunit F	P31979	nuoF	2.20	3.9	2.3E-06
Uncharacterized protein YrdD	P45771	yrdD	1.91	9.3	6.8E-04
Outer membrane lipoprotein RcsF	P69411	rcsF	1.75	3.5	9.6E-03
NAD-dependent dihydropyrimidine dehydrogenase subunit PreT	P76440	preT	1.67	2.1	3.3E-02

Table 1 – Significantly changed protein expression profile in H₂O₂ treated cells. (*) Proteins quantified with more than one peptide.

Sequence	Proteins	Gene names	Protein names	Control		H ₂ O ₂		Raw Ox ratio (1)	Expression profile (2)	Norm Ox ratio (3)	Norm Ox ratio Significance A p-value
				%Ox	CV(%)	%Ox	CV(%)				
VGDGTQDNLSGCEK	P00963	asnA	Aspartate--ammonia ligase	12.29	5.72	5.29	5.56	0.57	1.32	0.43	3.5E-02
TLEGWGYDYYVFDKVSSPVSTMMACPDGKK	P23827	eco	Ecotin	20.73	9.51	8.76	7.52	0.58	1.37	0.42	2.8E-02
LIDVTTICIGCK	P0AAJ5	fdoH	Formate dehydrogenase-O iron-sulfur subunit	32.55	14.06	14.25	9.93	0.78	1.78	0.44	4.3E-02
MAQLNSQNGVWSCTFVGVCSEVCPK	P0AC47	frdB	Fumarate reductase iron-sulfur subunit	7.97	14.18	3.10	10.04	0.8	2.05	0.39	9.1E-03
SQQVTDACK	P0AC33	fumA	Fumarate hydratase class I, aerobic	34.91	5.31	9.98	11.83	0.43	1.49	0.29	3.4E-05
DKGLILLSCGPYYNVLR	P22256	gabT	4-aminobutyrate aminotransferase GabT	25.81	4.88	9.81	28.07	0.53	1.42	0.38	6.4E-03
ECISENQILK	P0A9C0	glpA	Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit A	30.82	22.67	13.33	2.70	0.58	1.32	0.43	3.7E-02
SLAICTLLDKPSR	P0A9M2	hpt	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	43.85	22.73	15.33	28.53	0.49	1.25	0.35	1.7E-03
TGIVHYDKDVCTGCR	P0AAJ8	hybA	Hydrogenase-2 operon protein HybA	26.32	2.36	6.61	3.56	0.57	2.28	0.25	1.7E-06
VLVCVPVGATQVERR	P0A9X4	mreB	Rod shape-determining protein MreB	20.12	20.25	8.02	13.25	0.59	1.41	0.4	1.3E-02
KHSICPSGKR	P0A9L5	ppiC	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	29.28	3.75	12.91	5.47	0.63	1.43	0.44	4.6E-02
CHPFFTGK	P0A7M9	rpmE	50S ribosomal protein L31	10.08	15.76	4.02	14.32	0.91	2.29	0.4	1.3E-02
GEDVVVPGLFAVGEIACVSVHGANR	P0AC41	sdhA	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	16.85	13.28	7.18	20.62	0.56	1.32	0.43	3.1E-02
DDLPPVIDFWAPWCGPCR	P0AGG4	trxC	Thioredoxin-2	15.33	7.85	6.37	16.49	0.76	1.84	0.42	2.2E-02
HGANLILLDISPEIEKLADLCGR	P37440	ucpA	Oxidoreductase UcpA	33.11	19.35	13.89	20.89	0.66	1.51	0.42	2.5E-02
CHFHLPIYTPEVLTLCPK	P0AAT9	ybeL	Uncharacterized protein YbeL	9.91	8.20	4.40	15.02	0.84	1.88	0.44	5.0E-02
AGIEAANFPFCTIEPNTGVVPMPDPR	P0ABU2	ychF	Ribosome-binding ATPase YchF	6.26	26.31	2.68	21.48	0.53	1.21	0.43	3.2E-02
LVIECTGMADPGPIIQTFFSHEVLCQR	P24203	yjiA	Uncharacterized GTP-binding protein YjiA	12.72	15.38	5.54	9.81	0.62	1.37	0.44	4.1E-02

Table 2 – Significantly changed oxidized cysteine fractions in H₂O₂ treated cells. (1)Raw Ox ratio = iodoTMT2/iodoTMT1 (2)Expression profile = iodoTMT4/iodoTMT3 (3)Normalized Ox ratio = oxidized fraction in H₂O₂ (iodoTMT2/iodoTMT4)/oxidized fraction in control (iodoTMT1/iodoTMT3).

III. Discussion

H₂O₂ treated cells protein expression levels

Among the changed proteins expression levels in H₂O₂ treated cells, we found thioredoxin-1 (TrxA), thioredoxin-2 (TrxC), glutaredoxin-2 (GrxB) and glutaredoxin-3 (GrxC) to be up-regulated. All three proteins are involved in maintaining the redox homeostasis in *E. Coli* cells. TrxA and TrxC belong to the thioredoxin-thioredoxin reductase pathway while GrxB and GrxC belong to the glutathione pathway. The up-regulation of these proteins is the cell's response to the increase of H₂O₂ concentration due to the treatment. Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB was also found to be up-regulated, MsrB reduces methionine sulfoxides to methionine and is regenerated by the thioredoxin system (TrxA) [7]. DnaJ is a chaperone protein that is part of the DnaK/DnaJ/GrpE system, its human homologue Hdj2 is known to be redox regulated [8], exposure to ROS renders the DnaK/DnaJ/GrpE system no longer functional as an effective chaperone system [9] explaining its up-regulation to counter the inactivating oxidative stress effect. Ferric uptake regulation protein (fur) is a global regulator involved in the oxidative stress response and is known to bind to TrxA [10]. RNA polymerase-binding transcription factor DksA also binds to TrxA (and is a suppressor of DnaJ), it's a 4-cysteine zinc-finger protein that has been described as a thiol switch for sensing oxidative and nitrosative stress [11].

Besides the proteins involved in the response to oxidative stress, proteins involved in anaerobic growth were found to be up-regulated: frdB and fdoH. It has been shown that oxidation of reduced thiols resulting from oxidative stress causes *E. Coli* to switch to an anaerobic metabolism [12].

H₂O₂ treated cells cysteine oxidation levels

In order to inspect the changes in the redox state of cysteine residues in treated cell, we established the %Ox treated cells/%Ox control cells ratio and searched for outliers. This value reflects the combined effect of the change in the absolute quantity of an oxidized cysteine (Ox H_2O_2 /Ox Ctrl) and the change in the parent protein's expression level (expression profile). When examining these ratios (Table 2), different cases can be distinguished: i) the significant change in the oxidized fraction results from a significant change in the quantity of the oxidized residue, while the protein's expression profile remains unchanged, ii) the significant change in the oxidized fraction is mainly due to a change in protein's expression level, while the absolute quantity of the oxidized residue remains unchanged, and iii) the significant change in the oxidized fraction is a combined effect of the two other values, which may be both significantly changed or not. OxiTMT thus allows to distinguish different cellular events.

Our data show that most of the significantly changed redox states correspond to a decrease in the percentage of the oxidized fraction. This may seem paradoxical at first sight given the oxidizing nature of the treatment received by the *E. Coli* cells. Upon inspecting the significantly reduced cysteine residues, we find the TrxC peptide DDLPVVIDFWAPWCGPCR containing the protein's redox active site (Cys64 – Cys67) [13]. TrxC was also found to be up regulated, indicating an increase in the expression of the protein, it is expressed mostly in its reduced form to counteract the effects of the H_2O_2 treatment. While the ratio of the absolute quantity of the oxidized residue has decreased (Ox H_2O_2 /OxCtrl = 0.76), this change was not found to be significant. The change in the oxidized fraction is mostly due to the up-regulation of TrxC. The burst of exogenous H_2O_2 leads to the activation of the antioxidant response that includes not only the thioredoxin pathway but also the glutathione pathway, leading to an adaptation to the stress situation and establishing a more reducing environment. Similar results, showing a general increase of the

reduced fraction following an oxidizing treatment, have already been reported and also linked to an increase of the GSH/GSSG reducing potential [14].

Method limitations

The main aim of the present work is to show the possibility of using iodoacetyl tandem mass tags in a multiplex redoxomic quantitative analysis strategy. The experimental design proved itself to be adequate to generate proper information: change in the oxidized fraction of a cysteine with direct correlation to the parent protein's expression profile. The following step would be to develop and apply the strategy to the study of tissue and organ biopsies. The method is however not without limitations. Indeed as we were treating the data, we were faced with different challenges. One of them is inherent to reporter ion based quantification by mass spectrometry. Co-isolation of peptides with close m/z values leads to the contribution of contaminant species leading to an inaccurate quantification. This is especially true for un abundant species. This fact also means that oxidized cysteine reporter ions are more affected than total cysteine reporter ions. This is reflected by the calculated coefficient of variation as shown in Fig.3

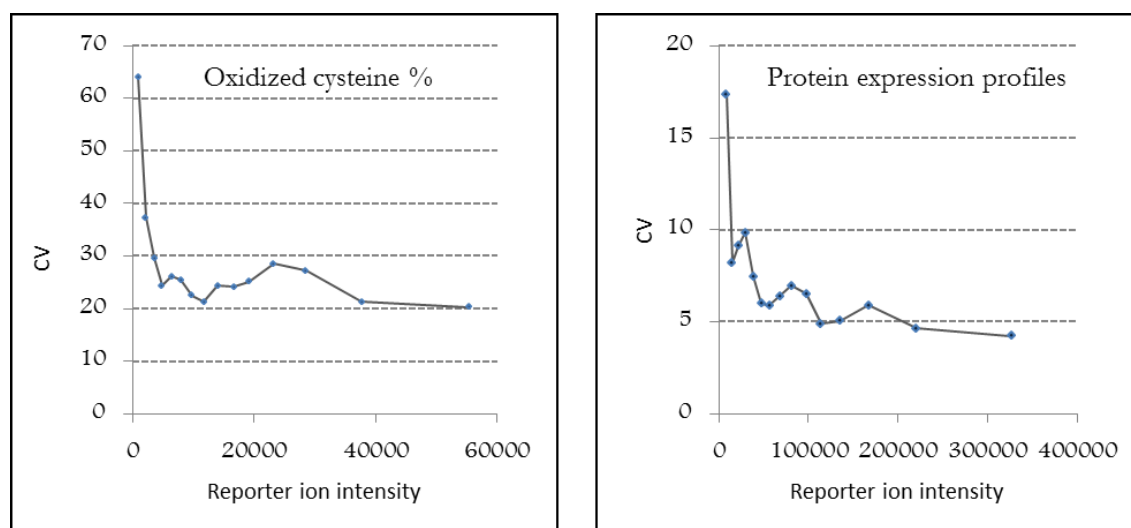


Fig. 3 The two sets of generated data were affected differently as shown by the average CV as a function of reporter ion intensity. Oxidized cysteine percentages are calculated based on the oxidized cysteine reporter ion which is much prone to be affected by contamination by comparison to the more intense total cysteine reporter

ion. The CVs for the oxidized fraction decrease with the reporter's intensity, stabilizing under 30%, our limit of acceptance for a quantitative value.

Another limitation of the method is that the calculation of the expression profile we establish is limited to cysteine containing peptides. The higher the number of peptides used for the quantification, the more robust the quantitative information is. Outliers (often peptides affected by multiple PTMs) are easily detected and eliminated. This advantage is unfortunately lost when the quantification is based on one peptide only. However, basing the expression profile on cysteine containing peptides hypnotizes that this information is available, which is not always the case with methods that exclude the modified peptide to calculate the parent protein's expression level.

IV. Conclusion

In this paper we reported a novel method, OxiTMT, for the simultaneous quantification of protein expression levels and oxidized cysteine residues. The iodoTMT reagent offers the possibility of comparing up to three different conditions in the same analysis. The method was confirmed on an *E. Coli* model treated with hydrogen peroxide. Results showed the method to be adequate for the analysis of cysteine PTM with a good coverage of the cysteine proteome. The OxiTMT concept allowed the generation of redox data that could be corrected by the protein expression profile. This information is crucial and must be integrated to all PTM studies, regardless of the concerned amino acid. In our case, the absolute quantity of the oxidized cysteins in the active site of TrxC showed no significant variation, but the expression profile showed the protein to be significantly up-regulated, thus indicating a decrease of the overall oxidized fraction. This helped explain the reducing environment, generated by the cells to counteract the effect of the hydrogen peroxide treatment.

While this paper serves as a proof of concept for the developed method, OxiTMT's potential benefits surpasses studies based simply on cell cultures. Indeed, contrary to

metabolic labeling (SILAC), chemical labeling of proteins such as iodoTMT labeling offers the possibility to apply these methods to the study of tissue since protein labeling occurs after the extraction phase. This opens the door to much varied fields of applications ranging from research to the development of diagnostic techniques.

V. Materials and methods

LC-MS grade acetonitrile (Fisher Chemical), iodoTMTsixplex™, Immobilized Anti-TMT™ Antibody Resin (Thermo Scientific), Tris, dithiothreitol, iodoacetamide, urea, octyl β -D-glucopyranoside, protease inhibitor Complete, LB medium (Sigma Aldrich), bovine sequencing-grade trypsin (Roche), trifluoroacetic acid, trichloroacetic acid, formic acid (Fluka), *E. Coli* XL1-Blue strain (Agilent Technologies).

Cell Growth and Harvesting. *E. coli* was grown aerobically in LB medium at 37 °C until OD₆₀₀ of 0.7 was reached. The culture was then split into 2 and with one fraction being incubated with 1 mM H₂O₂ for 30 min at 37 °C, and the other fraction not being treated and serving as control. Each condition was then split into two fractions and the cells were washed three times with water to remove the growing medium and added reagents.

IAM Labeling efficiency. In order to establish the optimal conditions, three protein extracts of 300 μ g each were subjected to different IAM blocking conditions. Extracts were resuspended in labeling buffer supplied either: 1. No alkylating agent, 2. 100 mM final concentration of IAM or 3. 200 mM final concentration of IAM. Following the IAM alkylation, each reaction medium was supplemented with 1 μ L of 10mM Dylight 550 maleimide sulfhydryl-reactive dye. 20 μ L of each extract were then separated by SDS-PAGE (12.5%). Gels were examined for fluorescence: excitation at 557 nm and emission at 572 nm (30 s accumulation).

OxiTMT Procedure. Cell lysis was performed by adding 20% trichloroacetic acid (TCA) and vortexing. Proteins were then pelleted by centrifugation (13,000 g, 4 °C, 1 hour) and

washed three times with ice cold acetone to remove excess TCA. One fraction from each condition was then resuspended in 600 μ L of denaturing buffer (DB) (Urea 6M, Tris 100mM pH 8.1, 1% octyl β -glucopyranoside, protease inhibitors) supplemented with iodoacetamide (IAM) (final concentration 200 mM) to block free thiols. The reaction was carried out at room temperature in the dark for 1 hour. Excess IAM was then removed by TCA precipitation and the protein pellet was washed with acetone as described above. Both fractions from each condition were then resuspended in 600 μ L DB supplemented with dithiothreitol (DTT) (final concentration 20 mM) to reduce oxidized thiols. The reaction was carried out at 37 °C for 2 hours. Excess DTT was removed by TCA precipitation. The protein pellets were then resuspended in 100 μ L DB supplemented each with the entire content of an iodoTMT reagent vial as follows:

Fraction	Label
Control oxidized thiol content	iodoTMT-126 (iodoTMT1)
H₂O₂-treated oxidized thiol content	iodoTMT-127 (iodoTMT2)
Control entire thiol content	iodoTMT-129 (iodoTMT3)
H₂O₂-treated entire thiol content	iodoTMT-130 (iodoTMT4)

The reaction was carried out at 37 °C in the dark following the manufacturer's instructions. Hence, for each condition, the fraction that received IAM treatment has solely its oxidized thiol content labeled with iodoTMT, while the fraction that didn't receive IAM treatment has its entire thiol content labeled with iodoTMT. Following the labeling reaction, 50 μ L of each fraction were collected and pooled (final volume 300 μ L). BCA protein assay confirmed an equivalent overall protein concentration in each fraction, while the remaining un-pooled part from each fraction was used for label free LC-MS analysis to further confirm a correct mixture of the different fractions. Excess iodoTMT was then removed from the pooled

mixture by TCA precipitation (300 μ L). The protein pellet was resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate and trypsin digested at 37 °C overnight.

Labeled Peptide Enrichment Step. Following the digestion step, peptides were lyophilized and then resuspended in 100 μ L tris buffered saline (TBS) pH 7.4 and loaded on 200 μ L of slurry anti-TMT resin. The TMT specific antibody enrichment step was carried out following the manufacturer's instruction (4 °C, overnight). The unbound fraction was next collected, the resin washed five times with TBS, while the enriched fraction was eluted using four column volumes of the elution buffer provided with the iodoTMT kit. Both unbound and enriched fractions were lyophilized and resuspended in 2% acetonitrile (ACN)/0.05% trifluoroacetic acid (TFA) aqueous solution.

Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS) Analysis. peptides were desalted on a trap column (Acclaim PepMap100, C_{18} , 5 μ m particles, 300 μ m i.d. x 5 mm length, Thermo Scientific) at 15 μ L/min flow rate with ACN/0.05% aq. TFA 2:98 (v/v) for 5 min, transferred to and eluted from the RP column (Acclaim PepMap100, C_{18} , 3 μ m particles, 75 μ m i.d. x 15 cm length, Thermo Scientific) at a flow rate of 220 nL/min using an ACN gradient from 2-40% B in 170 min then 40-50% B in 10min (buffer A: ACN/0.1% aq. FA 2:98 (v/v), buffer B: ACN/0.1% aq. FA 90:10 (v/v)). The eluted peptides were analyzed by a nano-ESI quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Q Exactive, Thermo Scientific) with the following parameters: one full MS acquisition (Resolution 70,000 at m/z 200, AGC target value 1e6, max. injection time 250 ms), followed by 10 MS/MS (TOP 10) with isolation window 2 m/z, fixed first mass 100 m/z, resolution 17,500 at m/z 200, AGC target value 5e4, max. injection time 120 ms, CE 30 and dynamic exclusion of 60 s.

Data Analysis. Protein identification was performed using MaxQuant (version 1.5.2.8) with the following parameters: reporter ion MS2 (iodoTMT 6plex), digestion mode specific (trypsin with max 2 missed cleavages allowed), database *E. Coli*, methionine oxidation and

cysteine carbamidomethylation were selected as variable modifications, first search peptide tolerance 20 ppm, main search peptide tolerance 6 ppm, MS/MS match tolerance 20 ppm. Quantitative data mining was performed using Perseus 1.5.1.6.

References

1. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics*. 2005 Jan 17;1703(2):93–109.
2. Chiappetta G, Ndiaye S, Igbaria A, Kumar C, Vinh J, Toledano MB. Chapter 10 - Proteome Screens for Cys Residues Oxidation: The Redoxome. In: Enrique Cadenas and Lester Packer, editor. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 2010 [cited 2013 Oct 21]. p. 199–216.
3. Leichert LI, Gehrke F, Gudiseva HV, Blackwell T, Ilbert M, Walker AK, et al. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 17;105(24):8197–202.
4. Pan K-T, Chen Y-Y, Pu T-H, Chao Y-S, Yang C-Y, Bomgardner RD, et al. Mass Spectrometry-Based Quantitative Proteomics for Dissecting Multiplexed Redox Cysteine Modifications in Nitric Oxide-Protected Cardiomyocyte Under Hypoxia. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Mar 20;20(9):1365–81.
5. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. 2008 Dec;26(12):1367–72.
6. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2008 Dec;4(1):44–57.
7. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*. 2014 Jan 8;66:75–87.
8. Choi H-I, Lee SP, Kim KS, Hwang CY, Lee Y-R, Chae S-K, et al. Redox-regulated cochaperone activity of the human DnaJ homolog Hdj2. *Free Radic Biol Med*. 2006 Feb 15;40(4):651–9.
9. Winter J, Linke K, Jatzek A, Jakob U. Severe Oxidative Stress Causes Inactivation of DnaK and Activation of the Redox-Regulated Chaperone Hsp33. *Mol Cell*. 2005 Feb 4;17(3):381–92.
10. Kumar JK, Tabor S, Richardson CC. Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 16;101(11):3759–64.
11. Henard CA, Tapscott T, Crawford MA, Husain M, Doulias P-T, Porwollik S, et al. The 4-cysteine zinc-finger motif of the RNA polymerase regulator DksA serves as a thiol switch for sensing oxidative and nitrosative stress. *Mol Microbiol*. 2014 Feb 1;91(4):790–804.
12. Molina-Quiroz RC, Loyola DE, Díaz-Vásquez WA, Arenas FA, Urzúa U, Pérez-Donoso JM, et al. Global transcriptomic analysis uncovers a switch to anaerobic metabolism in tellurite-exposed *Escherichia coli*. *Res Microbiol*. 2014 Sep;165(7):566–70.
13. Miranda-Vizuet A, Damdimopoulos AE, Gustafsson J-Å, Spyrou G. Cloning, Expression, and Characterization of a Novel *Escherichia coli* Thioredoxin. *J Biol Chem*. 1997 Dec 5;272(49):30841–7.

14. Dardalhon M, Kumar C, Iraqui I, Vernis L, Kienda G, Banach-Latapy A, et al. Redox-sensitive YFP sensors monitor dynamic nuclear and cytosolic glutathione redox changes. *Free Radic Biol Med.* 2012 Jun 1;52(0):2254–65.
-

V.5 Commentaires et conclusion

Nous avons vu dans cet article une première application biologique de la stratégie OxiTMT. Cette étude, qui a servi de preuve de concept, nous a permis de tester la faisabilité de la stratégie et de mettre en œuvre l'étape de traitement des données.

Le but du développement de cette stratégie était de répondre à la limitation majeure des stratégies basées sur des marquages métaboliques. Cependant, malgré les résultats intéressants que nous avons obtenus, nous restons au début du développement de la méthode vers des applications à des tissus et des biopsies d'organes. Nous devons répondre à plusieurs questions avant de pouvoir étendre les applications d'OxiTMT.

Il est évidemment plus facile de partir d'un nombre équivalent de cellules pour chacune des deux fractions de chaque échantillon quand il s'agit de cultures. Il est plus difficile de maîtriser cet aspect quand il s'agit d'un tissu. L'extraction des protéines de ce type d'échantillon s'effectue typiquement avec une sonde à ultrasons. Sachant qu'une telle extraction crée des microenvironnements à température et pression élevées, ceci peut être délétère pour la préservation de l'état redox des résidus cystéines dans l'échantillon. Il semble donc indispensable d'effectuer l'alkylation à l'IAM de la première fraction de l'échantillon et la réduction du contenu total en cystéine de la deuxième fraction pendant cette étape de sonication. Nous devrions bien sûr vérifier l'efficacité de ces étapes en présence d'ultrasons en s'assurant également que les phénomènes d'oxydation non spécifique restent limités. Il est également indispensable que l'efficacité d'extraction des protéines de chacune des deux fractions soit équivalente. L'extraction dans un tampon en présence d'IAM est-elle aussi efficace qu'une extraction en présence de DTT?

Les développements qui restent à effectuer sur la méthode OxiTMT se limitent cependant à l'étape de préparation de l'échantillon. Nous noterons que l'étape d'exploitation des données générées par OxiTMT est simple et directe par comparaison à OcSILAC. Ceci provient de la différence du type de données obtenu par chacune des deux méthodes.

Finalement, afin de continuer à optimiser la méthode, il est indispensable de répondre à la limitation provenant des contaminations affectant l'intensité des rapporteurs dû aux phénomènes de co-isolation d'espèces quasi-isobares. Dans ce cadre, nous pouvons penser à réaliser la quantification au niveau MS^3 au lieu du niveau MS^2 . En sélectionnant un des fragments générés par MS/MS le bruit affectant les rapporteurs est réduit d'une manière significative. Cette approche aura un impact positif surtout sur les espèces les moins abondantes. Cependant en passant du niveau MS^2 au niveau MS^3 nous perdons en sensibilité, ce facteur devrait donc être évalué. Finalement, ce type d'approche n'est pas possible sur l'appareil QqOrbitrap utilisé pendant ce projet, qui ne permet pas de réaliser des MS^3 avec sélection du parent. Ceci est possible sur les dernières configurations hybrides piège à ions - détecteur à haute résolution (Orbitrap, TOF, etc.)

Conclusion générale

Conclusion Générale

Depuis la découverte de la présence d'espèces réactives oxydantes (ROS) au sein des cellules et des organismes vivantes, l'intérêt dédié à leur étude n'a cessé de croître. L'établissement du concept de stress oxydatif a fait de ce domaine une branche à part entière des sciences du vivant. Et comme toute autre science, elle est en évolution permanente. De nos jours, les notions de stress oxydatif et homéostasie redox sont inséparables. Le grand intérêt porté aux études redox peut être expliqué par l'omniprésence des espèces réactives et leur implication dans de nombreuses voies de signalisation, processus biologiques et pathologies.

L'essor qu'a connu la spectrométrie de masse et les développements instrumentaux de cette technique ont ouvert la porte aux études protéomiques qui vont actuellement bien au-delà de la simple identification des protéines, et s'intéressent à finement caractériser les modifications post-traductionnelles et les quantifier. Spécifiquement, les modifications post-traductionnelles sur les résidus cystéines représentent un cas d'étude très intéressant dans le contexte du stress oxydatif et de l'homéostasie redox vu la réactivité de cet acide aminé avec les diverses espèces réactives.

Dans ce cadre, ce travail de thèse a permis le développement de stratégies analytiques pour caractériser et quantifier les modifications redox sur les résidus cystéines. Ainsi, nous avons d'abord développé la stratégie OcSILAC en couplant un marquage métabolique des cellules par isotopes stables à un marquage différentiel des cystéines réduites et oxydées avec un enrichissement sélectif de la fraction contenant des peptides possédant des cystéines oxydées. Le protocole, tel qu'il a été imaginé, a pour but de dépasser les limitations des méthodes redox développées jusqu'à présent, avec notamment :

- i) l'élimination de tout biais causé par une oxydation non spécifique durant la préparation de l'échantillon.
- ii) la correction de l'information quantitative concernant les modifications sur les cystéines par le profil d'expression de la protéine correspondante.
- iii) finalement l'enrichissement sélectif de la fraction oxydée, la moins représentée. OcSILAC fournit ainsi le rapport r_{ox} de la quantité d'une cystéine oxydée entre deux conditions, le rapport r_r de la quantité d'une cystéine réduite et le profil d'expression r .

Un des faits marquants du développement de la stratégie OcSILAC pour nous est la manière dont le travail a évolué. L'information recherchée au début se résumait au rapport des fractions oxydée et non oxydée d'un peptide contenant une cystéine et du niveau d'expression de la protéine. Nous nous sommes d'abord rendu compte que nous étions capables d'aller plus loin en calculant les pourcentages de ces fractions. Pour cela nous avons eu besoin de développer un algorithme qui permettait d'effectuer ces calculs vu le manque d'outils analytiques adaptés. L'obtention de données aberrantes (pourcentages négatifs, pourcentages supérieurs à 100) nous a poussés à vérifier les différentes étapes de nos calculs pour déceler la source d'erreur, et ensuite à nous interroger sur l'exactitude de nos hypothèses de départ.

Cette étape de réflexion nous a menés progressivement à distinguer 5 cas de figure représentant les conclusions émises sur les événements redox observés. La possibilité de pouvoir détecter des équilibres parallèles qui affectent le peptide étudié nous a menés à l'établissement des conditions formulées sous forme de trois conditions qui encadrent l'information générée par notre stratégie. Ces conditions s'appliquent aux études quantitatives des PTMs en général.

Une première application biologique du protocole développé a été réalisée sur un modèle de levure n'exprimant pas la thiorédoxine réductase. Ce modèle constitue pour nous un cas d'étude intéressant où une des deux voies redox majeures de la cellule est fortement perturbée. Le mutant étudié présente un nombre de défauts non présents chez la souche sauvage qui a servi comme référence. Cette application a permis de vérifier les performances du protocole OcSILAC quant à la couverture du protéome et surtout la couverture du redoxome de la cystéine. L'application au modèle Δ TRR1 a permis de retrouver des résultats validés pour ce modèle par des études génomiques et transcriptomiques. Et au-delà ces résultats connus, l'étude de la souche Δ TRR1 a permis de soulever des questions intéressantes, notamment par rapport au métabolisme du soufre dans des conditions de privation (*starvation*).

Une fois le protocole OcSILAC établi et testé, nous avons travaillé sur l'extension de notre méthode en l'adaptant à un kit de fractionnement subcellulaire qui existe commercialement. L'adaptation du protocole classique au fractionnement subcellulaire comprenait surtout la modification des conditions d'alkylation des cystéines réduites afin de préserver un blocage total avant la réduction des cystéines réversiblement oxydées. Il était

également important de contrôler que la procédure adaptée ne mène pas à l'oxydation non spécifique des résidus cystéines durant la préparation de l'échantillon.

Le kit commercial étant adapté aux cellules humaines, une première application de la procédure modifiée a été réalisée dans le cadre de l'étude du cancer anaplasique de la thyroïde. Le protocole modifié a été employé pour comparer une culture de cellules cancéreuses à la même souche ayant subi un traitement avec un petit ARN interférent (siRNA) empêchant l'expression de la protéine BAG3, protéine très étudiée pour sa responsabilité dans la progression de ce cancer. Cette étude faisait déjà partie des thématiques abordées par notre laboratoire dans le cadre d'une collaboration. Ainsi, nous avons pu comparer l'analyse de la souche traitée *sibag3* par la méthode OcSILAC avec fractionnement subcellulaire à l'analyse effectuée par un marquage SILAC classique. L'identification par OcSILAC d'un nombre de protéines non observées avec l'étude SILAC seule confirme l'intérêt du fractionnement subcellulaire et de l'enrichissement de la fraction oxydée du redoxome de la cystéine. Parmi ces protéines, certaines sont significativement sur ou sous-exprimées chez la souche traitée. L'ensemble des résultats obtenus a permis de mettre en évidence la présence de changements redox suite au traitement. Ces changements redox sont impliqués dans la réorganisation du cytosquelette et soulèvent la question de la régulation redox de la machinerie Hsp.

Malgré les points forts constatés pour la procédure OcSILAC, l'analyse quantitative des modifications post-traductionnelles fait toujours face à quelques défis. Nous avons évoqué la possibilité de détecter des modifications supplémentaires non observées dans l'analyse des données, mais cela dépend de la disponibilité des données quantitatives relatives au profil d'expression, à la fraction modifiée et à la fraction non modifiée. L'enrichissement par *biotin switch* concerne les cystéines oxydées uniquement, ainsi certaines séquences ne disposent que de l'information quantitative de la fraction oxydée. Est-il possible d'envisager un enrichissement des cystéines réduites également? Ceci devrait se faire en se basant sur un principe différent pour préserver le gain en gamme dynamique tout en conservant l'efficacité et le faible coût de l'alkylation à l'iodoacétamide également. L'élargissement de la gamme dynamique a été abordé pour le moment du côté de la préparation de l'échantillon uniquement. Peu d'optimisation a été effectuée du côté de l'analyse LC-MS puisque le travail a été mené dans le cadre d'études exploratoires, sans *a priori*. Une approche ciblée en spectrométrie de masse en employant la SRM (*Selected Reaction Monitoring*) ou la PRM (*Parallel Reaction Monitoring*) devrait être explorée pour pousser les limites de couverture du redoxome accessibles avec notre stratégie.

D'un autre côté le marquage métabolique limite l'application du protocole OcSILAC aux cultures cellulaires, notamment celles auxotrophes aux acides aminés utilisés pour le marquage. Ceci exclut malheureusement donc l'étude des tissus et des biopsies. Plus spécifiquement, le protocole OcSILAC adapté au fractionnement subcellulaire nécessite une quantité d'échantillon initiale supérieure vu le grand nombre d'étapes et la perte possible d'échantillon à chaque étape.

Ayant pris en compte la limitation de l'application d'OcSILAC aux cultures cellulaires, nous avons travaillé dans un deuxième temps sur le développement d'une méthode quantitative en se basant sur un principe différent, le marquage chimique. Le développement récent de réactifs iodoTMT (*tandem mass tag*) spécifiques de la cystéine, ouvre la possibilité de leur utilisation dans la quantification des modifications redox sur les résidus cystéines. La méthode OxiTMT ainsi développée se base sur le marquage du contenu total en cystéine d'un protéome par un des réactifs iodoTMT et la fraction oxydée du même protéome par un autre réactif iodoTMT. Ainsi, le protocole OxiTMT donne accès à l'information du profil d'expression et le pourcentage de la fraction oxydée, permettant de déduire le niveau de la fraction réduite.











Une première application de la méthode OxiTMT a été réalisée sur une culture de cellules d'*Escherichia coli* que nous avons comparée à une culture traitée avec du peroxyde d'hydrogène. Ce "cas d'école" a servi de preuve de concept et a permis de retrouver des résultats attendus tels que la surexpression des protéines des voies du contrôle redox. Cette première application a mis en évidence l'importante notion de cinétique dans le cas de traitement par un réactif comme le peroxyde d'hydrogène. En effet, la surexpression des protéines régulatrices pour le rétablissement de l'homéostasie redox conduit *in fine* à une baisse de la fraction oxydée du redoxome de la cystéine. Ceci a été constaté dans d'autres études similaires [189].

Malgré ses avantages, la procédure OxiTMT possède également sa part de limitations. La première étant une limitation intrinsèque à la quantification par rapporteurs isobariques en MS/MS. En effet, la co-isolation d'ions avec des valeurs de m/z proches mène à une co-fragmentation d'espèces autres que celle sélectionnée et donc une contribution des espèces contaminantes à la donnée quantitative. Cet effet est plus important pour les espèces minoritaires dont la quantification peut être totalement faussée par une autre espèce majoritaire co-isolée. Mais ceci est aussi vrai pour des espèces plus abondantes qui sont co-sélectionnées avec de nombreuses espèces ultra minoritaires qui ne dépassent pas le bruit de

fond mais dont les ions rapporteurs se confondent. D'un autre côté, l'utilisation des réactifs iodoTMT implique un coût de manipulation plus important. En moyenne, pour la même quantité d'échantillon traité le coût des réactifs iodoTMT est cinq fois plus important que le coût des réactifs SILAC.

Le Tableau 18 résume les points de force et de faiblesse des deux méthodes développées.

Tableau 18 - Comparaison des méthodes OcSILAC et OxiTMT

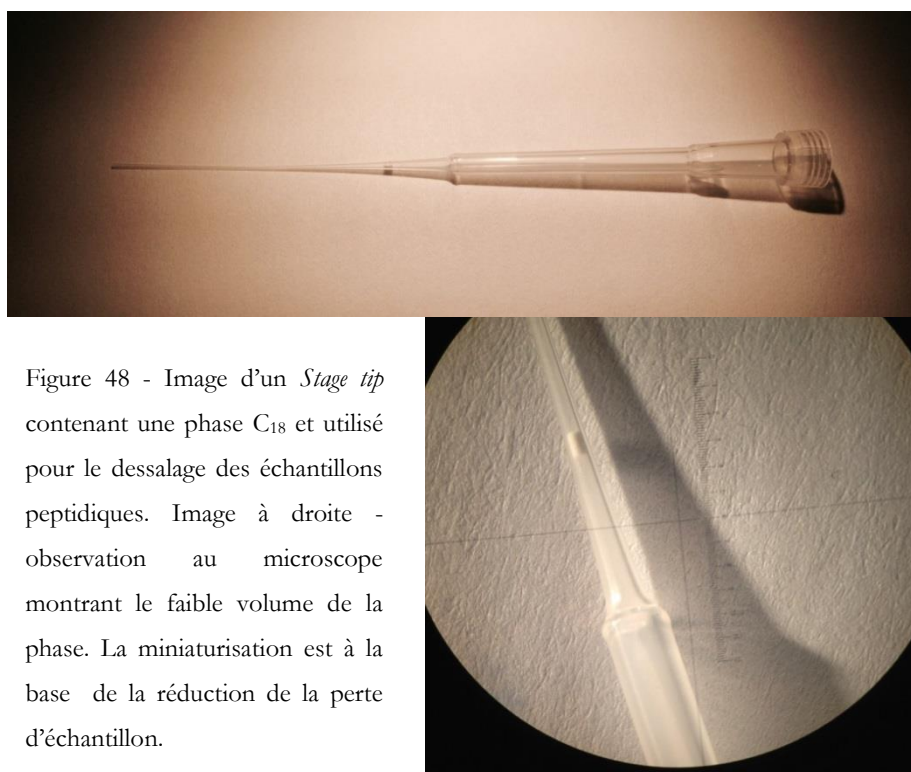
<i>OcSILAC</i>	<i>OxiTMT</i>
 Peu de biais dû à la manipulation de l'échantillon  Faible coût  Détection potentielle de modifications parallèles	 Accès direct au pourcentage de cystéine oxydée  Compatible avec l'étude des tissus
 Incompatible avec l'étude des tissus  Accès indirect à l'information des pourcentages	 Coût plus élevé  Problèmes de co-isolation d'espèces quasi-isobares  Quantification des protéines avec un seul peptide

Pendant ce projet de thèse, nous avons développé une boîte à outils offrant plusieurs choix pour des études rédoxomiques. Ces méthodes se complètent du point de vue des avantages et de l'innovation apportée par chacune d'elles. Dans le cas de la méthode OcSILAC, beaucoup de temps a été consacré au traitement bio-informatique et à l'étape de *data mining* qui restent cependant peu conviviaux à ce stade-là. Il serait intéressant de rendre ces étapes plus fluides, surtout qu'un des buts du développement de ces méthodes analytiques est de les mettre à la disposition de la communauté scientifique.

Malgré le côté innovateur d'OcSILAC et d'OxiTMT, nous avons conservé une étape qui reste commune à la grande majorité des procédures analytiques redox : le piégeage acide des thiols afin de préserver l'information redox sur les cystéines. Cette étape de précipitation par

l'acide trichloroacétique intervient également lors de l'élimination du premier réactif d'alkylation, l'élimination de l'agent réducteur et l'élimination du deuxième réactif d'alkylation. Chaque précipitation implique une perte du matériel de départ dont la quantité diminue au fur et à mesure du protocole. Ceci peut être surtout problématique dans le cas d'études appliquées à des échantillons biologiques peu abondants, notamment des biopsies d'organes et de tissus.

En gardant toujours le principe de piégeage acide, nous pouvons imaginer la miniaturisation comme une solution pour conserver l'échantillon. Les *Stage tips* sont des cônes de pipette effilés (ou *gel loader*) contenant de la phase C_{18} (Figure 48) qui existent commercialement et qui sont utilisés pour le dessalage d'échantillons de manière analogue aux cônes Ziptip. Ils sont conçus pour une perte minimale d'échantillon.



Le même système peut être facilement fabriqué en remplaçant la phase C_{18} par des filtres moléculaires (de taille variables 5 kDa, 10 kDa, etc.) en choisissant une taille pouvant retenir la majorité des protéines exprimées. Dans ce cas l'échantillon sera déposé au-dessus du filtre, le piégeage acide s'effectue normalement avec une rétention des protéines par le filtre. L'acide peut être ensuite éliminé à travers le filtre et l'agent alkylant ajouté par le côté supérieur et ainsi de suite pour les étapes suivantes du protocole. Il est évident que ces modifications du protocole validé nécessitent une nouvelle validation de toutes les étapes une par une. Notamment, il est essentiel de contrôler les pertes potentielles à travers le filtre,

et s'assurer que le filtre ne se colmate pas. Travailler avec de très faibles volumes nécessite de garder toujours une quantité suffisante de tampon pour resuspendre l'échantillon. L'efficacité du blocage des cystéines réduites dans ces conditions devra être testée à nouveau.

Finalement, des solutions alternatives au principe du piégeage acide peuvent être proposées, notamment le confinement de l'échantillon pour l'isoler de l'oxygène atmosphérique. Et en retenant la miniaturisation comme moyen de préserver l'échantillon, la microfluidique se propose comme une solution très intéressante [190]. Il est effectivement possible de confiner des solutions aqueuses dans des microgouttelettes entourées d'une solution d'huile fluorée non miscible, agissant comme phase de transport [191]. La Figure 49 est une séquence d'images montrant un exemple de la manipulation de ses microgouttelettes.

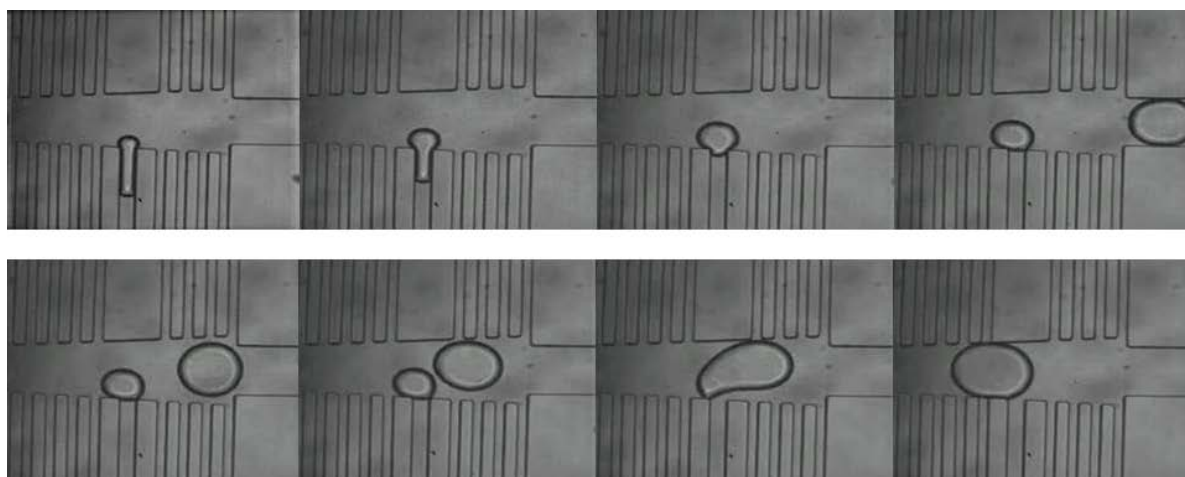


Figure 49 - Séquence d'images (de gauche à droite) montrant l'introduction d'une gouttelette puis sa fusion avec une autre microgouttelette. Les microgouttelettes sont aqueuses et transportées par une phase organique non miscible.

Il est possible de contrôler ces microgouttelettes, de fusionner plusieurs microgouttelettes pour ajouter des réactifs, mélanger, incuber et retourner les microgouttelettes en modifiant les paramètres. Ceci offre la possibilité d'effectuer des réactions, de changer le milieu réactionnel et d'extraire le contenu tout en préservant le confinement de l'échantillon. Ces conditions opératoires sont très intéressantes pour des applications en protéomique en général et des applications en protéomique redox spécifiquement. Notre laboratoire possède l'avantage de faire partie de l'Institut Pierre-Gilles de Gennes, centre d'excellence en microfluidique. L'adaptation des méthodes développées à la microfluidique constitue désormais un des axes de recherche du laboratoire pérennisant le travail accompli pendant ce projet de thèse.

Une des notions les plus importantes pendant ce travail était la caractérisation de la fraction modifiée d'une PTM, et donc le besoin de prendre en compte le profil d'expression de la protéine. Ce profil d'expression est établi en quantifiant des peptides protéotypiques, qui peuvent eux aussi être modifiés! Sommes-nous capables d'estimer de tels biais en protéomique? D'un autre côté, nous pouvons nous poser des questions quant à la signification biologique d'une fraction modifiée vs. la quantité absolue d'un résidu modifié. Les processus biologiques sont-ils modulés par un changement de la fraction modifiée? Ou est-ce que ceci est plutôt le résultat d'une augmentation de la concentration locale de la protéine, et donc du résidu modifié sans changement dans sa fraction? Est-ce une combinaison de ces deux effets? Est-ce que nous sommes capables actuellement de répondre à de telles questions? Différentes sondes existent pour mesurer les potentiels redox locaux, mais ces sondes sont spécifiques d'une molécule particulière ou de l'état redox d'une protéine. Ces possibilités restent des pistes intéressantes à explorer, surtout par rapport aux petites molécules. En effet, les ROS ont été évoqués pendant tout ce travail sans être réellement mesurés ou caractérisés. Nous avons surtout caractérisé leurs influences sur les protéines. Mais finalement, est-ce que le potentiel redox est entièrement régi par ces espèces? Nous avons vu dans la première application d'OxiTMT qu'une augmentation de l'expression des protéines redox a mené à une baisse globale des fractions oxydées des cystéines. Ces protéines participent sûrement au potentiel redox global de la cellule. Quelle est l'importance de l'influence de chacune de ces familles?

Finalement, nous avons développé des méthodes de caractérisation des PTM des cystéines, mais les informations obtenues ne permettent pas de déterminer la nature de la modification. Nous avons vu que la modification peut être aussi bien une nitrosylation qu'une glutathionylation, etc. Les états d'oxydation supérieurs n'ont été que légèrement abordés. Une cystéine modifiée pourrait en fait être répartie sur plusieurs modifications. Est-ce que nous pouvons adapter nos méthodes pour qu'elles soient capables d'effectuer une spéciation des différentes PTMs? Quel serait le coût à payer au niveau de la précision? De la robustesse? De la sensibilité? Et de la quantité d'échantillon nécessaire? D'une manière analogue, nous nous sommes uniquement intéressés aux résidus cystéines, or d'autres résidus sont sensibles également aux conditions redox (méthionine, histidine). Est-ce que nous avons une image totale du redoxome sans la caractérisation de ces résidus? Et d'une manière plus globale, il est de plus en plus évident que les PTMs sont intimement liées. La problématique du *cross-talk* est d'actualité en protéomique. Les phénomènes redox sont très étudiés dans le cadre du diabète par exemple. Et dans ce même cadre la glycosylation l'est

également. D'autres exemples peuvent être cités. Est-il judicieux de continuer la caractérisation des PTMs d'une manière isolée? Sommes-nous capables d'entreprendre des études globales des PTMs? Ou sommes-nous à la limite de la capacité instrumentale et informatique en protéomique?

Annexes

Annexe I : La spectrométrie de masse et le couplage nanoLC-MS

I.1 Historique

Historiquement, l'analyse du protéome utilisait la technique de gel bidimensionnel (2D) suivie d'une détection de protéines par des moyens colorimétriques, marquage par fluorophores ou encore mesure de radioactivité. Bien que ces méthodes de détection permettent de visualiser des milliers de protéines, elles souffrent d'un certain nombre de limitations (sensibilité pour le bleu de Coomassie, défaut de linéarité pour le nitrate d'argent). De plus, sauf protocoles particuliers, seules les protéines solubles sont visualisables sur le gel, les protéines membranaires demandant une mise au point complexe pour être analysées [192]. En outre, il n'y a aucune identification de la (les) protéine(s) sous-jacente(s), et les gels 2D ont bien souvent une répétabilité limitée [193]. Les marquages par fluorescence et radioactivité sont extrêmement sensibles mais limitent l'analyse *a posteriori*.

C'est pourquoi des techniques complémentaires telles que la spectrométrie de masse, ont connu un essor fulgurant dans le domaine de la protéomique avec l'avènement dans les années 80 de deux nouvelles techniques d'ionisation douce capables de mesurer la masse des grosses molécules: l'ionisation électrospray (ESI) [194] et la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) [195]. La spectrométrie de masse est aujourd'hui un outil incontournable pour caractériser les biomolécules de façon sensible et universelle. Ces deux modes d'ionisation ont valu le prix Nobel en 2002 à J.B. Fenn et K. Tanaka. Seul le processus d'ionisation ESI, utilisé au cours de ce projet sera détaillé dans cette annexe.

Désormais, les spectromètres de masse permettent d'analyser des échantillons biologiques complexes, pouvant contenir des milliers de protéines, dont certaines sont présentes en faible quantité. Cependant, l'étude des systèmes biologiques représente un défi technique d'actualité pour la spectrométrie de masse. En effet, d'après le groupe de Bantscheff [146], du fait de l'étendue de la gamme dynamique des protéines cellulaires, seulement une fraction des protéines présentes dans l'échantillon est identifiée, dont une partie minime est quantifiable à cause de la qualité des spectres, du faible rapport signal

sur bruit, de la résolution ou encore de la suppression spectrale (Figure 50). Aujourd'hui, l'enjeu analytique est d'augmenter la couverture du protéome.

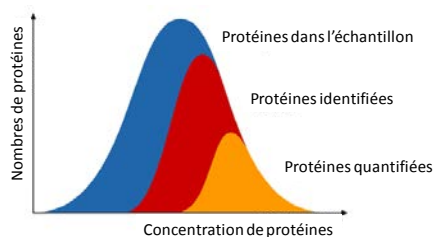


Figure 50 : Représentation schématisée des fractions du protéome (en bleu) qui peuvent être identifiées (en rouge) et quantifiées (en orange) par spectrométrie de masse. Etant donné la grande gamme dynamique des protéines cellulaires, seule une partie est identifiée et quantifiée (figure adaptée de Bantscheff et al.).

I.2 Principe

Tous les spectromètres de masse sont constitués de 4 éléments : (1) une source d'ionisation pour produire des ions en phase gazeuse, (2) un analyseur de masse pour séparer les ions produits selon leur rapport masse sur charge (m/z), (3) un (ou plusieurs) détecteur qui enregistre le signal des ions séparés par l'analyseur en produisant un courant électrique dont l'intensité est corrélée au nombre d'ions détectés, et enfin (4) un traitement de signal pour obtenir un spectre de masse d'intensité en fonction du rapport m/z .

L'analyseur et le détecteur constituent un même élément dans le cas des analyseurs à haute résolution à piège d'ions et analyse par transformée de Fourier (FT) de type résonance cyclotronique d'ions (ICR) et piège à ions orbitaire (Orbitrap).

I.3 Source d'ionisation: NanoElectrospray (NanoESI)

Les cibles d'étude en protéomique ne sont souvent malheureusement présentes qu'à de très faibles concentrations (sub femtomoles). Ainsi de nombreux efforts ont été menés par différentes équipes de recherche afin d'augmenter la sensibilité de la méthode ESI. Tous les efforts ont été motivés par le fait qu'une partie infime des ions analytes parvient au détecteur. La perte d'information a lieu dans l'optique ionique (transfert et analyse) mais aussi à cause de la désolvatation incomplète des gouttelettes et de la faible transmission de ces ions après production à pression atmosphérique vers une région à très basse pression. Pour diminuer ces pertes, l'évaporation des solvants (chauffage, gaz) et le guidage des ions (optique, géométrie) sont continuellement optimisés dans les développements instrumentaux [196].

En plus des modifications à l'intérieur du spectromètre de masse, une miniaturisation de l'ESI même a été entreprise pour gagner en sensibilité dans les années 90 [197], [198], [199]. L'abaissement du débit améliore fortement l'efficacité d'ionisation. En effet, la formation d'un plus petit cône de Taylor et donc la production de gouttelettes chargées plus petites permettent d'avoir une meilleure efficacité de désolvatation. Les gouttelettes étant plus petites, le processus d'évaporation est plus efficace, et le capillaire peut être placé à une distance plus proche de l'orifice d'entrée dans l'analyseur (1-2mm). Ceci a pour conséquence une plus grande transmission des ions vers l'analyseur par rapport à l'ESI conventionnel. Une meilleure efficacité d'ionisation est également observée grâce à une charge par unité de volume plus élevée. Enfin, la réduction du débit de travail engendre une diminution de la consommation de solvant et une diminution du flux gazeux dans les analyseurs. Ce dernier point est un avantage pour coupler ce type de source qui travaille à pression atmosphérique à un analyseur à très basse pression (10^{-10} mbar) tel que l'Orbitrap.

Un petit volume d'échantillon (quelques μL) est introduite dans un capillaire en général de silice ou métal de faible diamètre interne ($10\text{ }\mu\text{m}$ en général), permettant d'atteindre de faibles débits, de l'ordre du $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$. Ce capillaire est recouvert ou non de matériau conducteur pour appliquer la tension de l'ordre de 1 à 2 kV.



Figure 51 : Photographie d'un capillaire nanoESI (SillicapTip™, New Objective).

I.4 Les analyseurs

L'analyseur reçoit les molécules ionisées, extraites puis focalisées, via une optique ionique de transmission constituée d'un jeu de lentilles et de multipôles. Les analyseurs permettent de séparer les ions selon leur m/z . Presque tous les analyseurs peuvent être couplés à l'ESI : le quadrupole (Q), le temps de vol (TOF), le piège à ions quadripolaire (IT), le piège à ions orbitalaire (Orbitrap) ou encore la cellule à résonance cyclotronique d'ions (ICR).

Le choix de l'analyseur conditionne la mesure de masse. Chaque type d'analyseur présente des caractéristiques différentes qui peuvent être résumées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Récapitulatif des différentes performances des analyseurs.

<i>Analyseur</i>	<i>Pression</i>	<i>Résolution</i>	<i>Précision</i> (étalonnage externe)	<i>Gamme de</i> <i>masse</i>	<i>Vitesse</i> <i>d'acquisition</i>	<i>Gamme</i> <i>dynamique</i>
Q	10^{-6} mbar	2 000 à $400m/z$	100 ppm	8000	élevée	10^6
IT	10^{-5} mbar	5 000 à $400m/z$	100 ppm	6000	élevée	10^4
TOF	10^{-8} mbar	20 000 à $400m/z$	20-50 ppm	500000	moyen	10^4
Orbitrap	10^{-10} mbar	100 000 à $200m/z$	10 ppm	10^3 Da	moyen	10^4
FT-ICR	10^{-10} mbar	1 000 000 à $400m/z$	5 ppm	4000	lente	10^4

I.4.1 Résolution

La résolution est le pouvoir de l'analyseur à séparer deux signaux de m/z proches. Plus la résolution est élevée, plus la distance entre deux signaux considérés comme distincts est petite. La résolution à mi-hauteur (FWHM, *Full Width at Half Maximum*) est définie comme le rapport $m/\Delta m$ où m est la masse de l'ion que l'on considère et Δm la largeur à mi-hauteur (Figure 52).

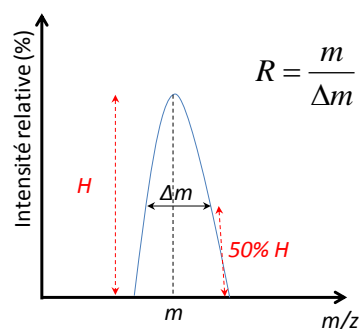


Figure 52 : Résolution à 50%

I.4.2 Précision de masse

La précision qualifie l'aptitude de l'analyseur à fournir des masses qui sont proches de la valeur vraie. En métrologie, un analyseur précis est donc à la fois fidèle (erreur aléatoire) et juste (erreur systématique), c'est à dire que le pic doit être étroit et centré sur la valeur vraie (Figure 53 D).

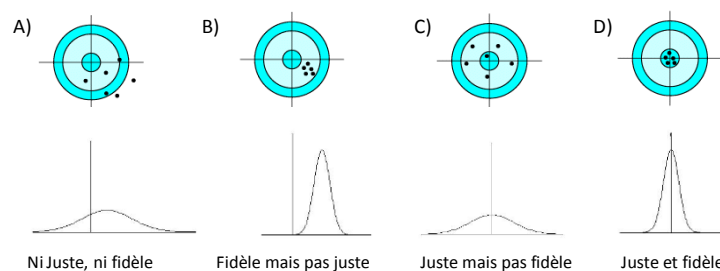


Figure 53 : Illustration de la fidélité et la justesse. A) la valeur finale est ni juste ni fidèle, on obtient un pic large éloigné de la valeur vraie, B) la valeur finale est fidèle mais pas juste, on obtient un pic étroit mais la valeur finale est éloignée de la valeur vraie, C) la valeur finale est juste mais pas fidèle, on obtient un pic large centré à la valeur vraie, D) la valeur finale est juste et fidèle, on obtient un pic étroit centré à la valeur vraie (figure adaptée de <http://www.univ-brest.fr/lpo/instrumentation/02.htm> et <http://www.yorku.ca/psycho/fr/postscript.asp>).

La justesse est exprimée par le rapport de l'écart absolu entre la valeur vraie et la valeur mesurée sur la valeur vraie, exprimée en ppm (partie par million).

$$Erreur \text{ (ppm)} = \frac{|M_{théorique} - M_{mesurée}|}{M_{théorique}} \times 10^6$$

En spectrométrie de masse, la justesse par abus de langage, est souvent confondue avec la précision de mesure. C'est souvent cette erreur de justesse qui est donnée dans les publications. Lors des interrogations dans les banques de données, chaque spectre est considéré individuellement et la masse correspond à la masse du centroïde du pic, la tolérance en masse renseignée correspond à l'erreur de justesse. La fidélité n'est donc pas prise en compte. Pour prendre en compte un défaut de fidélité sur certains spectromètres, il est parfois nécessaire d'élargir la fenêtre d'interrogation pour intégrer ces erreurs aléatoires [200].

Dans le cas de mélanges complexes, le nombre de peptides générés est conséquent (plusieurs dizaines de milliers). De plus, plus la banque de données comporte un grand nombre de séquences, plus le nombre de faux positifs augmente. Ainsi, il est indispensable d'utiliser un spectromètre de masse capable de fournir des masses exactes pour limiter le nombre de candidats possibles. Plus l'erreur de justesse est faible plus le nombre de séquences candidates erronées décroît rapidement. Ainsi une justesse de l'ordre du ppm permet d'exclure 99% des peptides qui présentent la même masse nominale (masse obtenue à partir des masses isotopiques arrondies à l'unité) mais de composition en acide aminé différente. Une grande exactitude de mesure induit ainsi une grande robustesse dans l'interprétation des résultats [200], [201].

I.4.3 Gamme de masse

La gamme de masse est l'étendue du domaine m/z que l'analyseur est capable de mesurer. En ESI, la gamme de masse requise est moins importante qu'en MALDI car la formation d'ions multichargés diminue l'étendue des m/z des analytes.

I.4.4 Vitesse d'acquisition

La vitesse d'acquisition correspond au nombre de spectres par unité de temps que peut fournir l'analyseur. Elle est souvent exprimée en hertz (s^{-1}). Plus cette vitesse est grande, plus le nombre de protéines identifiées dans un mélange sera grand et donc plus grande sera la couverture du protéome. Ceci dit, il est important de rappeler que la très haute vitesse se fait souvent au détriment de la résolution.

Cette vitesse d'acquisition est liée au temps de cycle, c'est-à-dire le temps mis pour faire une acquisition MS et les MS/MS associées. Ce temps cycle doit être inférieur au temps d'élution des peptides dans le système chromatographique. En effet, plus un spectromètre est rapide, plus le nombre d'événements réalisables au cours du cycle est important. En analyse *shotgun*, un cycle court permet de fragmenter plus de peptides. En analyse ciblée, un temps de cycle réduit permet d'obtenir une quantification plus robuste avec plus de points de mesure.

I.4.5 Gamme dynamique

La gamme dynamique d'un analyseur est l'étendue des concentrations relatives détectables simultanément. C'est-à-dire, sa capacité à détecter un analyte minoritaire en présence d'un analyte très abondant. La détection d'analytes très peu abondants est critique, car généralement les biomarqueurs des maladies sont présents en de très faibles quantités.

Le sang [202] présente un bon exemple de très grande gamme dynamique avec une étendue sur plus de 10 décades (Figure 54). Les 10 protéines majoritaires représentent 90% de la totalité des protéines plasmatiques (Figure 55). Et parmi ces protéines, l'albumine représente à elle seule, plus de 50 % de la quantité totale de protéine [203]. Ainsi plusieurs stratégies d'analyse ont été mises en place pour augmenter la gamme dynamique de l'analyse telles que la déplétion des protéines majoritaires [204], un fractionnement ou encore une séparation chromatographique en amont de l'analyse de masse.

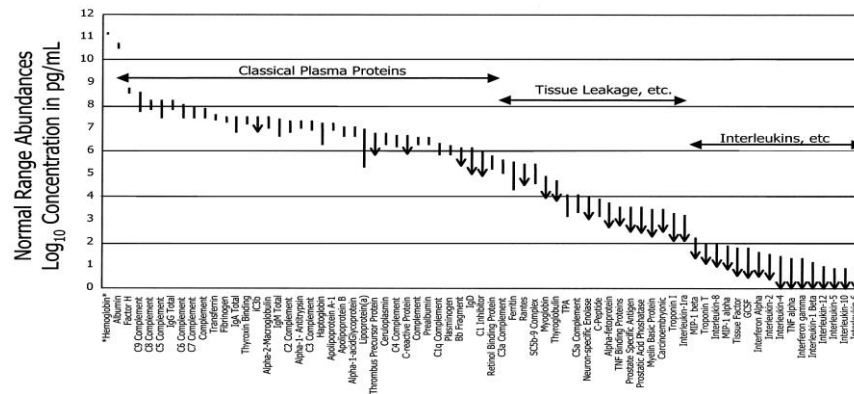


Figure 54 : Concentration de 70 protéines dans le plasma. Une différence de concentration de plus de 10 décades existe entre la protéine la plus abondante et la moins abondantes [202].

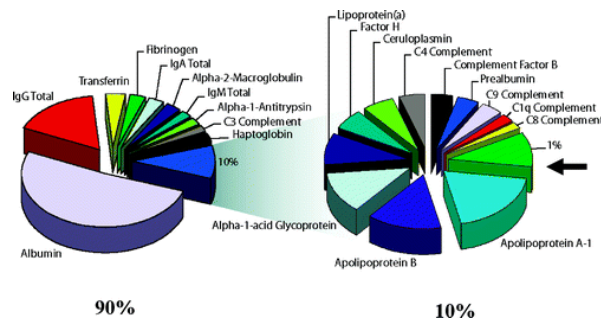


Figure 55 : Répartition des principales protéines plasmatiques [203].

I.5 La spectrométrie de masse tandem (MS/MS)

Lorsque plusieurs analyseurs sont couplés séquentiellement, on parle de spectrométrie tandem (MS² ou MS/MS). Dans ce cas, l'ion d'intérêt (dit ion parent ou ion précurseur) est isolé dans le premier analyseur, puis cet ion est fragmenté par collision d'un gaz inerte, électron ou photon. Enfin, les ions fragments produits sont séparés suivant leur rapport masse sur charge (m/z) dans le troisième analyseur. Selon les instruments utilisés, ces étapes se font soit dans l'espace soit dans le temps.

I.5.1 La fragmentation générale des peptides

Pour l'identification des protéines, une fragmentation des peptides protéotypiques est souvent nécessaire afin de recueillir des informations de séquence. Pour cela, la connaissance du mécanisme de fragmentation des peptides en phase gazeuse est nécessaire pour corréliser les spectres expérimentaux obtenus aux spectres théoriques découlant des règles de fragmentation. Les différents types de fragments générés sont

dépendants de différents facteurs tels que la séquence primaire, l'énergie apportée, de la pression ou encore l'état de charge de l'analyte.

La nomenclature des fragments adoptée aujourd'hui a été initiée par Roepstorff et Fohlman en 1984 [103] puis complétée par Biemann en 1990 [104].

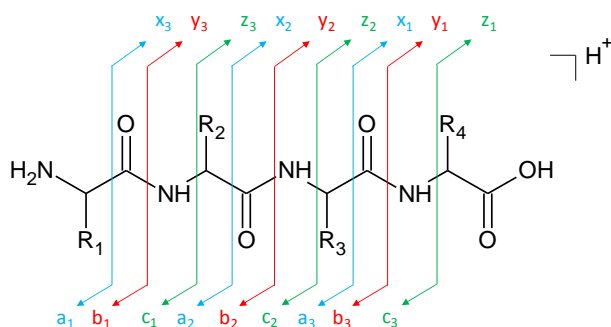


Figure 56 : Nomenclature de la fragmentation de la chaîne peptidique pour un térapeptide.

La rupture d'une liaison dans la chaîne peptidique peut avoir lieu à trois endroits différents décrits à la Figure 56. La numérotation correspond au nombre de résidus contenus dans le fragment.

Lorsque l'énergie de fragmentation fournie est élevée, une rupture de la chaîne latérale peut avoir lieu, donnant plus d'information sur la structure des acides aminés mis en jeu [205], [206]. D'autres fragments, appelés fragments secondaires, peuvent également se produire par perte d'eau, d'ammoniaque ou du groupement carbonyle CO.

Il existe quatre grands types de fragmentation permettant d'apporter de l'énergie au système et menant chacun à des types d'ions fragments préférentiels :

✓ **CID à basse énergie** (*low-energy collision-induced dissociation*) qui nécessite des énergies faibles de l'ordre de l'électron volt (eV). C'est le cas des triple-quadrupôles, pièges à ions quadripolaires et qToF. Pour les appareils équipés d'un Orbitrap, c'est la fragmentation HCD (*higher energy dissociation*) qui est employée. Elle est similaire au CID à basse énergie. Les ions b et y sont principalement générés par ces collisions. Seule la fragmentation HCD qui a été utilisée au cours de ce projet sera détaillée dans cette annexe.

✓ **CID à haute énergie** (*high-energy collision-induced dissociation*) qui emploie des énergies de collision de l'ordre du kilo-électron volt (keV). C'est le cas des instruments ToF/ToF. Tous les types d'ions peuvent être générés par ces collisions. Une rupture de la chaîne latérale peut également avoir lieu avec cette fragmentation.

✓ **ECD** (*electron capture dissociation*) qui utilise des électrons de basse énergie pour induire la dissociation des grands peptides ou des protéines. Ce type de fragmentation est employé dans les appareils de type FT-ICR. Les ions c et z sont principalement générés par cette collision.

✓ **ETD** (*electron transfer dissociation*) où les peptides/protéines se dissocient par transfert d'électron d'un donneur anionique. Ce type de fragmentation est employé dans les appareils de type qTOF ou Orbitrap. Les ions c et z sont principalement générés par cette collision.

✓ **IRMPD** (*infrared multiphoton dissociation*) où les peptides/protéines se dissocient par excitation vibrationnelle. Ce type de fragmentation est employé dans les appareils de type FT-ICR. Les ions b et y sont principalement générés par cette collision.

I.5.2 Dissociation induite par collision à plus haute énergie (HCD)

La fragmentation C-Trap à plus haute énergie (HCD, *higher-energy C-Trap dissociation*) a été introduite en 2007 par Olsen et al. [207] pour une analyse des fragments à haute résolution avec l'Orbitrap. À cette époque, la C-Trap servait de lieu de stockage des ions avant leur entrée dans l'analyseur et également de lieu de fragmentation. Les mots « plus haute énergie » se réfèrent à une tension de radiofréquence appliquée plus élevée en HCD pour retenir les fragments dans la C-Trap et non à une plus grande énergie utilisée pour fragmenter les peptides. Cette tension est de 2500V alors qu'elle est de 1500V dans les autres instruments. L'énergie de collision appliquée est entre 20 et 50eV pour fragmenter les peptides.

Aujourd'hui les fragmentations de type HCD, renommée « dissociation à plus haute énergie » (*higher energy collisional dissociation*), ont lieu dans une cellule de collision constituée d'octopoles, distincte de la C-Trap. Une radiofréquence (RF *only*) est appliquée dans cette cellule. Cette dernière est remplie d'un gaz identique à celui de la C-Trap pour ralentir les ions, l'azote, qui sert à fragmenter les peptides.

Les ions précurseurs, sélectionnés par le quadripôle, traversent les multipôles de transfert et la C-Trap pour être fragmentés dans la cellule de collision HCD. Ces ions sont ensuite accélérés vers cette cellule HCD par application d'une différence de potentiel entre la C-Trap et la cellule HCD. Etant donné que la pression dans cette cellule est assez élevée (effet dû à la présence du gaz), un gradient de potentiel doit être appliqué pour assurer la bonne transmission des ions dans la cellule. Les ions entrent en collision avec des molécules de gaz neutre (azote par défaut) dans la cellule entraînant la rotation, puis

l'étirement et finalement rupture des liaisons, aboutissant à la création d'ions fragments chargés et de neutres. Ces derniers sont éliminés du système par pompage. Les fragments sont ensuite renvoyés vers la C-Trap en appliquant un gradient de potentiel pour être focalisés et accélérés avant leur détection en Orbitrap (Figure 57 et Figure 58). Tout comme en fragmentation CID, ce sont des ions fragments de type b et y qui sont principalement générés par la fragmentation HCD. De plus, tous les ions fragments générés et transférés sont détectés, sur le modèle de fonctionnement du piège ionique (ce qui est favorable à une haute sensibilité).

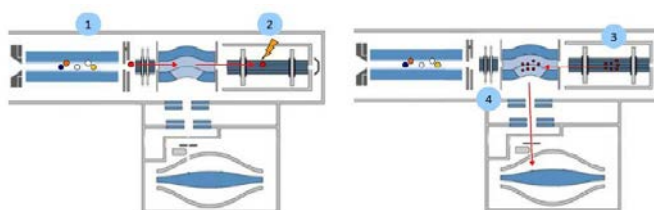


Figure 57 : Fragmentation HCD des ions précurseurs dans un QqOrbitrap. Les ions précurseurs sont d'abord sélectionnés par le premier quadripôle puis transférés vers la cellule de collision HCD pour être fragmentés. Ces derniers sont ensuite transférés vers la C-Trap avant leur détection sur l'Orbitrap [figure tirée du manuel de l'utilisateur du Q Exactive, Thermo Scientific].

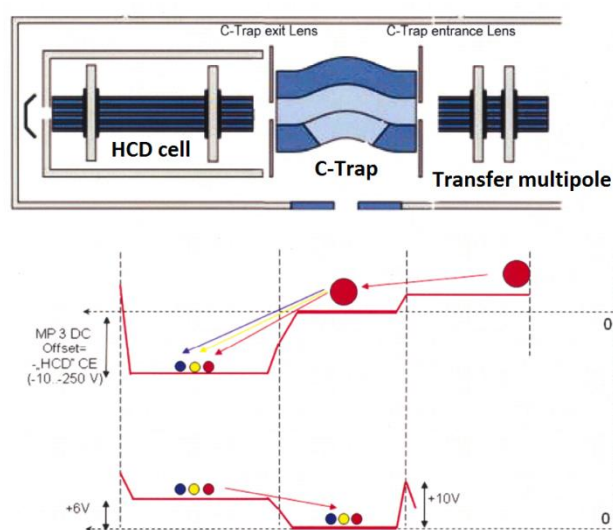


Figure 58 : Potentiel appliqué pour la fragmentation en HCD. Les ions sélectionnés dans le quadripôle sont transférés vers la cellule de collision HCD via le multipôle de transfert et la C-Trap avec des différences de potentiel. Un gradient de potentiel est également appliqué dans la cellule de collision pour augmenter la transmission des ions dans cette cellule où ils vont être fragmentés par collision dans un gaz. Les fragments sont ensuite transférés vers la C-Trap en appliquant un gradient de potentiel avant d'être détectés dans l'Orbitrap [figure tirée du manuel d'utilisateur du Q Exactive, Thermo Scientific].

I.6 Le couplage avec la chromatographie

Dans des analyses protéomiques exploratoires, le but est d'identifier un maximum de protéines. Or du fait de la complexité des échantillons biologiques, une analyse en spectrométrie de masse seule n'est pas suffisante pour analyser plusieurs milliers de composés en même temps. Depuis les années 80, le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse à source d'ionisation à pression atmosphérique est très utilisé pour l'analyse des biomolécules. Aujourd'hui, le défi analytique est d'accroître la capacité de pic, c'est-à-dire obtenir le maximum de composés séparés dans une fenêtre de temps donnée [208]. Ce couplage permet l'identification de centaines, voire de milliers de protéines, dans un mélange en routine [209].

I.6.1 Généralités

La chromatographie liquide (LC) fut découverte par Tswett en 1903, pour la séparation de pigments. Elle est aujourd'hui utilisée en protéomique comme technique analytique qui permet de séparer les peptides (solutés) obtenus après digestion des protéines contenues dans les cellules et tissus issus des biopsies dans notre cas. L'échantillon, solubilisé dans un solvant, est transporté à travers la phase stationnaire (colonne chromatographique) par une phase mobile (éluant). La séparation se fait suivant un partage d'interactions soluté/phase stationnaire/phase mobile.

La chromatographie liquide est bien adaptée à la séparation des composés biologiques car ce sont des mélanges complexes et cette technique permet d'analyser des composés indépendamment de leur polarité et de leur masse moléculaire. C'est la chromatographie à polarité de phases inversée (RPLC, *reverse phase liquid chromatography*) qui est souvent employée en analyse protéomique. La phase stationnaire hydrophobe est composée de particules de silice greffées C₁₈. L'élution se fait par une augmentation du pourcentage de solvant organique de la phase mobile facilitant l'ionisation ESI. Les peptides d'intérêt sont séparés en fonction de leur hydrophobicité en RPLC.

À pH acide (pH 2-3), la charge globale des peptides est positive, favorable au couplage avec la spectrométrie de masse. L'ajout d'un modificateur organique crée une paire d'ions et rend les solutés plus hydrophobes, facilitant les échanges avec la phase stationnaire hydrophobe. Afin d'être compatible à l'analyse de masse en mode d'ionisation ESI, des tampons volatils sont utilisés. Ce sont l'acide formique (HCOOH) et l'acide acétique (CH₃COOH) qui sont les plus utilisés. Ces modificateurs

permettent non seulement d'accroître la rétention, par la formation de paires d'ions, mais également d'accroître la résolution de la séparation en RPLC. Un autre modificateur souvent utilisé en chromatographie, l'acide trifluoroacétique (TFA) est déconseillé dans le cas de couplage direct avec la masse car cet acide fort, attaque l'acier et provoque également des phénomènes de suppression d'ions [210].

I.6.2 La nano-chromatographie (nanoLC)

Depuis sa découverte, la chromatographie n'a cessé d'évoluer. Tout d'abord avec la haute pression (HPLC, *high-performance liquid chromatography*), l'ultra-chromatographie (UHPLC, *ultra-high-performance liquid chromatography*) mais aussi la nano-chromatographie (nanoLC, *nano-liquid chromatography*), par une miniaturisation des colonnes de chromatographie et de l'instrumentation.

Cette évolution a rendu possible l'analyse de mélanges de plus en plus complexes en faible concentration grâce à son pouvoir résolutif, sa sensibilité accrue par la diminution des diamètres internes des colonnes chromatographiques et sa facilité de couplage avec un mode d'ionisation efficace en nanoESI.

La diminution des diamètres internes des colonnes engendre une diminution de la dilution chromatographique et donc une augmentation de la concentration locale de l'analyte par rapport à un système classique d'HPLC.

$$D = \frac{C_0}{C_{max}} = \frac{\varepsilon_T \pi r^2 (1+k) \sqrt{2\pi r L H}}{V_{inj}}$$

où C_0 : concentration initiale, C_{max} : concentration maximale au sommet du pic, ε : porosité de la colonne, r : rayon de la colonne, k : facteur de rétention, L : longueur de la colonne, H : hauteur équivalente à un plateau et V : volume d'échantillon injecté.

Le gain de la sensibilité peut être déterminé par l'équation suivante:

$$f = \frac{d_1^2}{d_2^2} \text{ avec } d_1 > d_2$$

où d_1 : diamètre colonne 1 et d_2 : diamètre colonne 2.

Le gain de sensibilité progresse de presque de 4000 fois entre une colonne classique de 4.6 mm et une nano-colonne de 75 μm [211]. Cependant, la diminution du diamètre de colonne a un impact sur tout l'assemblage instrumental.

I.7 Configuration instrumentale

I.7.1 QqOrbitrap

I.7.1.1 Généralités

Le QqOrbitrap (Q Exactive, Thermo Scientific), illustré à la Figure 59, est composé d'une source nanoESI, puis d'une succession d'un ensemble de guide d'ions (*S-Lens* et *S-Lens exit lens*) et d'une série d'optiques d'ions (*flatapole*, *bent flatapole* et *lens*) avant d'arriver au quadripôle. Puis, les ions sont transmis via une optique spécifique (C-Trap et Z-Lens) avant d'être détectés dans l'Orbitrap à haute résolution et grande exactitude de mesure de la masse (HR/AM, *High-Resolution/Accurate-Mass*). Les ions peuvent également subir des fragmentations dans la cellule de collision HCD et les ions fragments sont également détectés à HR/AM dans l'Orbitrap.

Bien que la mesure des ions précurseurs et fragments se déroule dans l'Orbitrap, si le réglage de la méthode est bien défini, cet instrument permet de réaliser des événements MS et MS/MS en parallèle. Dans cette configuration, lorsque les premiers ions N sont détectés dans l'Orbitrap, un autre paquet d'ions N+1 peut au même moment être accumulé dans la C-Trap, rendant le temps d'un cycle d'analyse limité par le temps d'acquisition du transient dans l'Orbitrap (Tableau 20), et/ou par le temps de remplissage de la cellule de collision.

La configuration de ces analyseurs dans l'espace permet en outre de faire du multiplexage, c'est à dire d'accumuler plusieurs ions en même temps avant de mesurer la masse exacte dans l'Orbitrap. Le processus de traitement de signal FT est également intégré dans cet instrument.

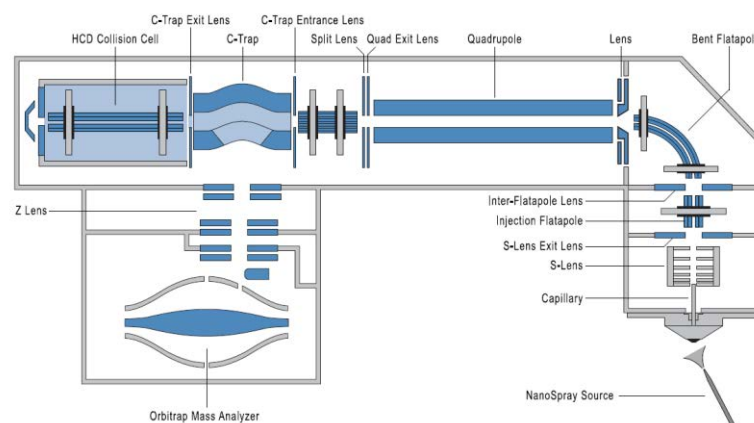


Figure 59 : Schéma détaillé du Q Exactive (Thermo Scientific). Les ions ionisés en nanoESI sont focalisés et transmis vers le quadropole qui laisse passer soit tous les ions ou un type d'ions spécifiques. Ils traversent ensuite la C-Trap pour être soit éjectés vers l'Orbitrap pour la mesure exacte des ions précurseurs ou fragmentés dans la cellule HCD avant de revenir dans le C-Trap et enfin éjectés vers l'Orbitrap pour une mesure juste des ions fragments.

1.7.1.2 Mode d'acquisition employé : *Data-dependent acquisition (DDA)*

En routine, des acquisitions de type DDA (Figure 60) sont réalisées sur le QqOrbitrap. Les ions précurseurs sont tout d'abord mesurés dans l'Orbitrap à haute résolution (70 000 à m/z 200) et grande exactitude (10 ppm). Pendant l'acquisition du transient, les ions correspondant à l'espèce la plus abondante sont fragmentés dans la cellule de collision HCD puis transférés vers la C-Trap. Ensuite, pendant que les premiers fragments N sont analysés dans l'Orbitrap à haute résolution, la seconde espèce N+1 est fragmentée et accumulée dans la C-Trap. Le temps d'accumulation dans la C-Trap est proche du temps nécessaire pour générer le transient d'ions des fragments, soit 64 ms à 17 500 de résolution (Tableau 20).

Tableau 20 : Temps d'acquisition du transient.

Résolution (à m/z 200)	Fréquence d'acquisition DDA	Temps d'acquisition du transient
17 500	12 Hz	64 ms
35 000	7 Hz	128 ms
70 000	3 Hz	256 ms
140 000	1.5 Hz	512 ms

Ainsi, un maximum de 10 ions les plus intenses (TOP 10) peuvent être fragmentés et analysés dans l'Orbitrap en 1s à haute résolution. Le Q Exactive permet la mesure des fragments à haute résolution, ce qui augmente la robustesse de l'analyse.

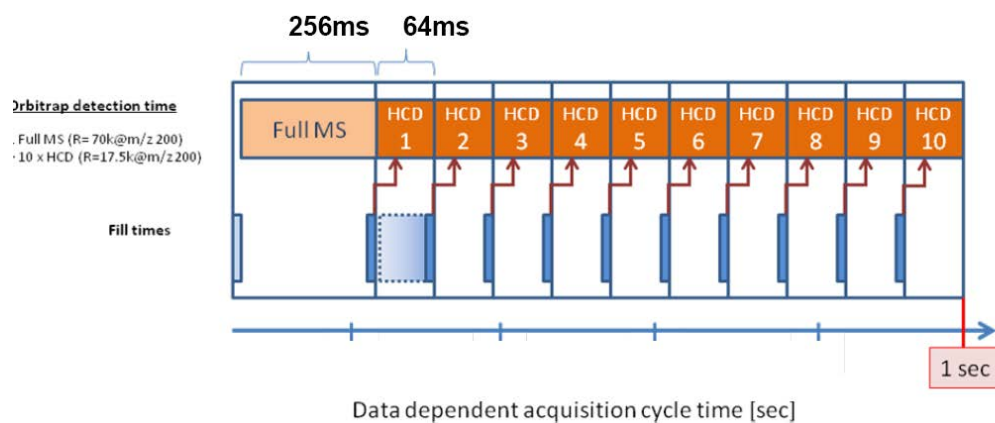


Figure 60 : Acquisition data-dépendante (DDA) sur le QqOrbitrap. Les ions précurseurs sont d'abord accumulés dans la C-Trap puis éjectés vers l'Orbitrap où les ions sont mesurés à HR/AM (70 000, 10ppm). Pendant l'acquisition du transient d'ions, un paquet d'ions correspondant aux ions les plus intenses est sélectionné par le quadripôle pour être fragmenté dans la cellule de collision HCD puis transféré dans la C-Trap. En même temps que la détection de ces ions les plus intenses, un deuxième paquet d'ions est fragmenté et accumulé dans la C-Trap. La tenue de ces événements en parallèle permet de faire une fragmentation des 10 ions les plus intenses à HR/AM (17 500, 20 ppm) en 1 seconde (Q Exactive, Thermo Scientific).

Annexe II : Protocoles expérimentaux

II.1 La séparation en nano-LC

La séparation des mélanges peptidiques s'effectue en nano-LC sur un appareil Ultimate 3000 RSLCnano System (Dionex) et une colonne Acclaim PepMap C18 (Dionex) 75 μm (diamètre interne) \times 50 cm (longueur) \times 3 μm (granulométrie). La séparation est précédée d'une étape de préconcentration en ligne (5 minutes) sur une précolonne Acclaim PepMap C18 (Dionex) 100 μm (diamètre interne) \times 2 cm (longueur) \times 5 μm (granulométrie). L'élution s'effectue à un débit constant de 220 nL/min et un gradient linéaire de 2% à 50% de tampon B en 180 minutes. Tampon A : 98% eau, 2% acétonitrile, 0,1% acide formique. Tampon B : 90% acétonitrile, 10% eau, 0,1% acide formique.

II.2 L'analyse MS

L'analyse des espèces éluée s'effectue sur un appareil QExactive (Thermo Scientific) en mode *data-dependent analysis*. Paramètres MS : résolution 70000, *AGC target* 10^6 , temps maximal d'injection 250 ms, gamme de masse 400 à 2000 Th. Paramètres MS/MS : résolution 17500, *AGC target* 5×10^4 , top 10, m/z minimum fixe 100 Th, fenêtre d'isolation 2 m/z , énergie de collision 30.

II.3 La recherche avec le logiciel MaxQuant

OcSILAC : La recherche bio-informatique est effectuée avec le logiciel MaxQuant version 1.3.0.5. Paramètres de recherche : multiplicité 2, enzyme trypsine, première recherche tolérance de 20 ppm, recherche principale tolérance de 6 ppm, recherche MS/MS tolérance 20 ppm, marqueurs métaboliques : lysine 8 et arginine 10, modifications variables : oxydation des méthionines et carbamydométhylation des cystéines.

OxiTMT : La recherche bio-informatique est effectuée avec le logiciel MaxQuant version 1.5.2.8. Paramètres de recherche : type ions rapporteurs MS2, enzyme trypsine, première recherche tolérance de 20 ppm, recherche principale tolérance de 6 ppm, recherche MS/MS tolérance 20 ppm, tolérance sur les ions rapporteurs 0,01 Da,

marqueurs isobariques iodoTMT6plex, modifications variables : oxydation des méthionines et carbamydométhylation des cystéines.

II.4 La recherche avec le logiciel Proteome Discoverer

Les recherches pour vérifier l'efficacité du marquage SILAC sont effectuées avec le logiciel Proteome Discoverer version 1.4.1.14 utilisant le moteur de recherche Mascot. Paramètres de recherche : analyseur FTMS, fragmentation HCD, banque de recherche SwissProt, enzyme trypsine, recherche MS tolérance de 10 ppm, recherche MS/MS tolérance de 20 mmu, modifications variables : oxydation des méthionines, carbamydométhylation des cystéines, marquage métabolique lysine 8 et marquage métabolique arginine 10.

II.5 Le traitement avec le logiciel Pinpoint

Afin de vérifier l'efficacité du marquage métabolique des cellules par les acides aminés lourds, les résultats de recherche obtenus par Proteome Discoverer sont traités par le logiciel Pinpoint. Les résultats de recherche (.msf) sont chargés et la liste des peptides identifiés est complétée de manière à avoir deux versions de chaque peptide (lourde et légère) dans la liste des masses à extraire. La largeur de pics extraits est fixée à 30 s, l'intensité minimale de signal est fixée à 10^4 . La tolérance en MS est fixée à 10 ppm et la tolérance en MS/MS est fixée à 20 ppm. Le logiciel Pinpoint fournit une estimation des aires de chaque version du peptide ainsi que le rapport H/L. Ce rapport est utilisé pour estimer l'efficacité de marquage selon :

$$\text{efficacité (\%)} = [H/(H+L)] \times 100$$

Références

1. Brigelius-Flohé R. Commentary: oxidative stress reconsidered. *Genes Nutr.* 2009 Sep;4(3):161–3.
2. Sies H, editor. *Oxidative stress*. London: Orlando : Academic Press; 1985. 507 p.
3. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct;8(10):813–24.
4. Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012 May;24(5):981–90.
5. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118–26.
6. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet.* 1994 Sep 10;344(8924):721–4.
7. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free Radicals in Biological Materials. *Nature.* 1954 Oct 9;174(4432):689–91.
8. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005 May 1;77(5):598–625.
9. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973 Jul;134(3):707–16.
10. Nohl H, Hegner D. Do Mitochondria Produce Oxygen Radicals in vivo? *Eur J Biochem.* 1978 Jan 1;82(2):563–7.
11. Grivennikova VG, Vinogradov AD. Mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biochem Mosc.* 2013 Dec;78(13):1490–511.
12. Lavoisier A-L de. *Oeuvres de Lavoisier*. Tome 2 / [éd. par J.-B. Dumas, E. Grimaux et F.-A. Fouqué] [Internet]. Impr. impériale (Paris); 1862 [cited 2015 May 13]. Available from: <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k86267w>
13. West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2011 Jun;11(6):389–402.
14. Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May 16;103(20):7607–12.
15. Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD. Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward and Reverse Reactions. *J Biol Chem.* 2012 Aug 3;287(32):27255–64.
16. Muller FL, Liu Y, Remmen HV. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *J Biol Chem.* 2004 Nov 19;279(47):49064–73.

17. Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 1985 Mar;237(2):408–14.
18. Forman HJ, Kennedy J. Dihydroorotate-dependent superoxide production in rat brain and liver: A function of the primary dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*. 1976 Mar;173(1):219–24.
19. Drahota Z, Chowdhury SKR, Floryk D, Mráček T, Wilhelm J, Rauchová H, et al. Glycerophosphate-Dependent Hydrogen Peroxide Production by Brown Adipose Tissue Mitochondria and Its Activation by Ferricyanide. *J Bioenerg Biomembr*. 2002 Apr 1;34(2):105–13.
20. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, et al. Mitochondrial α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species. *J Neurosci*. 2004 Sep 8;24(36):7779–88.
21. Canton M, Menazza S, Lisa FD. Oxidative stress in muscular dystrophy: from generic evidence to specific sources and targets. *J Muscle Res Cell Motil*. 2014 Mar 12;35(1):23–36.
22. De Duve C, Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev*. 1966;46(2):323–57.
23. Smith JJ, Aitchison JD. Peroxisomes take shape. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 décembre;14(12):803–17.
24. del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. *Plant Physiol*. 2006 Jun;141(2):330–5.
25. Hu J, Baker A, Bartel B, Linka N, Mullen RT, Reumann S, et al. Plant Peroxisomes: Biogenesis and Function. *Plant Cell*. 2012 Jun;24(6):2279–303.
26. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*. 2002 Sep 15;33(6):774–97.
27. López-Huertas E, Sandalio LM, Gómez M, Del Río LA. Superoxide Radical Generation in Peroxisomal Membranes: Evidence for the Participation of the 18-kDa Integral Membrane Polypeptide. *Free Radic Res*. 1997 Jan 1;26(6):497–506.
28. Bedard K, Krause K-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007 Jan 1;87(1):245–313.
29. Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, Nielsen MH, Borregaard N. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood*. 1994;83(6):1640–9.
30. Ambruso DR, Cusack N, Thurman G. NADPH oxidase activity of neutrophil specific granules: requirements for cytosolic components and evidence of assembly during cell activation. *Mol Genet Metab*. 2004 avril;81(4):313–21.

31. Garcia RC, Segal AW. Changes in the subcellular distribution of the cytochrome b-245 on stimulation of human neutrophils. *Biochem J.* 1984 Apr 1;219(1):233–42.
32. Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CXC, et al. Regulation of NAD(P)H Oxidase by Associated Protein Disulfide Isomerase in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem.* 2005 Dec 9;280(49):40813–9.
33. Takac I, Schröder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, et al. The E-loop Is Involved in Hydrogen Peroxide Formation by the NADPH Oxidase Nox4. *J Biol Chem.* 2011 Apr 15;286(15):13304–13.
34. Crane FL, Low H. Reactive oxygen species generation at the plasma membrane for antibody control. *Autoimmun Rev.* 2008 juillet;7(7):518–22.
35. Morré DJ, Morré DM. Aging-Related Cell Surface ECTO-NOX Protein, arNOX, a Preventive Target to Reduce Atherogenic Risk in the Elderly. *Rejuvenation Res.* 2006 mai;9(2):231–6.
36. Yasui H, Hayashi S, Sakurai H. Possible Involvement of Singlet Oxygen Species as Multiple Oxidants in P450 Catalytic Reactions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005;20(1):1–13.
37. Montezano AC, Touyz RM. Reactive Oxygen Species and Endothelial Function – Role of Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nox Family Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012 Jan 1;110(1):87–94.
38. Hussain T, Gupta S, Mukhtar H. Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2003 Mar 10;191(2):125–35.
39. Nikolic D, van Breemen RB. DNA Oxidation Induced by Cyclooxygenase-2. *Chem Res Toxicol.* 2001 avril;14(4):351–4.
40. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 2002 Jan 1;82(1):47–95.
41. Adibhatla RM, Hatcher JF. Phospholipase A2, Reactive Oxygen Species, and Lipid Peroxidation In CNS pathologies. *BMB Rep.* 2008 Aug 31;41(8):560–7.
42. Kim CM, Kim JH. BMB reports: Mini Review; Cytosolic phospholipase A2, Lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *Biochem Mol Biol Rep.* 2008;41(8):555–9.
43. Ermak G, Davies KJA. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol.* 2002 février;38(10):713–21.
44. Ali AA, Coulter JA, Ogle CH, Mignaud MM, Hirst DG, Robson T, et al. The contribution of N2O3 to the cytotoxicity of the nitric oxide donor DETA/NO: an emerging role for S-nitrosylation. *Biosci Rep [Internet].* 2013 Mar 28 [cited 2015 May 26];33(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3610299/>
45. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992 Sep 1;6(12):3051–64.

46. Martínez MC, Andriantsitohaina R. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Mar;11(3):669–702.
47. Giles GI, Jacob C. Reactive Sulfur Species: An Emerging Concept in Oxidative Stress. *Biol Chem*. 2002 Apr 12;383(3-4):375–88.
48. Gruhlke MCH, Slusarenko AJ. The biology of reactive sulfur species (RSS). *Plant Physiol Biochem*. 2012 Oct;59:98–107.
49. Gray MJ, Wholey W-Y, Jakob U. Bacterial Responses to Reactive Chlorine Species. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67:141–60.
50. Pattison DI, Davies MJ. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. *Curr Med Chem*. 2006;13(27):3271–90.
51. Vesela A, Wilhelm J. The role of carbon dioxide in free radical reactions in organism. *Physiol Res*. 2002;51(4):335–40.
52. Popa-Wagner A, Mitran S, Sivanesan S, Chang E, Buga A-M. ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:1–14.
53. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics*. 2005 Jan 17;1703(2):93–109.
54. Stadtman ER, Levine RL. Protein Oxidation. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Jan 1;899(1):191–208.
55. Rhee SG, Jeong W, Chang T-S, Woo HA. Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance. *Kidney Int*. 2007;72(S106):S3–8.
56. Schöneich C. Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics*. 2005 Jan 17;1703(2):111–9.
57. Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol*. 2001 Sep;36(9):1495–502.
58. Letavayová L, Marková E, Hermanská K, Vlčková V, Vlasáková D, Chovanec M, et al. Relative contribution of homologous recombination and non-homologous end-joining to DNA double-strand break repair after oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*. 2006 May 10;5(5):602–10.
59. Jena NR. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci*. 2012 Jun 26;37(3):503–17.
60. Hogg M, Wallace SS, Doublie S. Bumps in the road: how replicative DNA polymerases see DNA damage. *Curr Opin Struct Biol*. 2005 Feb;15(1):86–93.
61. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007 Feb 9;12(5):913–22.

62. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009 Oct 22;461(7267):1071–8.
63. Miyamoto S, Ronsein GE, Prado FM, Uemi M, Corrêa TC, Toma IN, et al. Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *IUBMB Life*. 2007 Jan 1;59(4-5):322–31.
64. Arai H. Oxidative Modification of Lipoproteins. In: Kato Y, editor. *Lipid Hydroperoxide-Derived Modification of Biomolecules* [Internet]. Springer Netherlands; 2014 [cited 2015 Jun 2]. p. 103–14. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-7920-4_9
65. Terao J. Cholesterol Hydroperoxides and Their Degradation Mechanism. In: Kato Y, editor. *Lipid Hydroperoxide-Derived Modification of Biomolecules* [Internet]. Springer Netherlands; 2014 [cited 2015 Jun 2]. p. 83–91. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-7920-4_7
66. Singh SP, Wishnok JS, Keshive M, Deen WM, Tannenbaum SR. The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14428–33.
67. Abdul-Aziz A, MacEwan DJ, Bowles KM, Rushworth SA. Oxidative Stress Responses and NRF2 in Human Leukaemia. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2015 [cited 2015 Jun 2];2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4396545/>
68. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Jul;8(7):579–91.
69. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 2010 Jan 1;38(1):96–109.
70. Toledano MB. The Guardian Recruits Cops: The p53-p21 Axis Delegates Prosurvival Duties to the Keap1-Nrf2 Stress Pathway. *Mol Cell*. 2009 Jun 26;34(6):637–9.
71. Taverne YJHJ, Bogers AJJC, Duncker DJ, Merkus D. Reactive Oxygen Species and the Cardiovascular System. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2013 [cited 2015 Jun 3];2013. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3655680/>
72. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, et al. The Yin and Yang of Oxidation in the Development of the Fatty Streak A Review Based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Jul 1;16(7):831–42.
73. Fischer R, Maier O. Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2015 [cited 2015 Jun 3];2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4365363/>
74. Mazzetti AP, Fiorile MC, Primavera A, Lo Bello M. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int*. 2015 Mar;82:10–8.

75. Cahill-Smith S, Li J-M. Oxidative stress, redox signalling and endothelial dysfunction in ageing-related neurodegenerative diseases: a role of NADPH oxidase 2. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Sep 1;78(3):441–53.
76. Lionaki E, Tavernarakis N. Oxidative stress and mitochondrial protein quality control in aging. *J Proteomics*. 2013 Oct;92:181–94.
77. Juránek I, Nikitovic D, Kouretas D, Hayes AW, Tsatsakis AM. Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. *Food Chem Toxicol*. 2013 Nov;61:240–7.
78. Jones DP. Redox theory of aging. *Redox Biol*. 2015 Aug;5:71–9.
79. Miseta A, Csutora P. Relationship Between the Occurrence of Cysteine in Proteins and the Complexity of Organisms. *Mol Biol Evol*. 2000 Aug 1;17(8):1232–9.
80. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J*. 1998 May 1;17(9):2596–606.
81. Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Sanjuán Szklarz LK, Schulze-Specking A, et al. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J*. 2004 Sep 29;23(19):3735–46.
82. Hell K. The Erv1–Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2008 Apr;1783(4):601–9.
83. Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Sep;11(9):655–67.
84. van der Vliet A, Janssen-Heininger YMW. Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: Murderer, mediator, or messenger? *J Cell Biochem*. 2014 Mar;115(3):427–35.
85. Love NR, Chen Y, Ishibashi S, Kritsiligkou P, Lea R, Koh Y, et al. Amputation-induced reactive oxygen species (ROS) are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat Cell Biol*. 2013 Feb;15(2):222–8.
86. Ren F, Wang K, Zhang T, Jiang J, Nice EC, Huang C. New insights into redox regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 2015 Aug;1850(8):1518–26.
87. Steinhubl SR. Why Have Antioxidants Failed in Clinical Trials? *Am J Cardiol*. 2008 May 22;101(10, Supplement):S14–9.
88. Hanschmann E-M, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, Lillig CH. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Nov;19(13):1539–605.
89. Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med*. 2004 Feb;25(1–2):17–26.

90. Al-Mehdi A-B, Pastukh VM, Swiger BM, Reed DJ, Patel MR, Bardwell GC, et al. Perinuclear Mitochondrial Clustering Creates an Oxidant-Rich Nuclear Domain Required for Hypoxia-Induced Transcription. *Sci Signal*. 2012 Jul 3;5(231):ra47.
91. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014 Dec;224:164–75.
92. Lillig CH, Berndt C, Holmgren A. Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 2008 Nov;1780(11):1304–17.
93. Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. *J Biol Chem*. 2012 Feb 10;287(7):4403–10.
94. Nguyễn-nhu NT, Knoop B. Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. *Toxicol Lett*. 2002 Oct 5;135(3):219–28.
95. Jeong W, Bae SH, Toledano MB, Rhee SG. Role of sulfiredoxin as a regulator of peroxiredoxin function and regulation of its expression. *Free Radic Biol Med*. 2012 Aug 1;53(3):447–56.
96. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *FEBS J*. 2008 Aug 1;275(15):3959–70.
97. Indo HP, Yen H-C, Nakanishi I, Matsumoto K, Tamura M, Nagano Y, et al. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr*. 2015;56(1):1–7.
98. Eason MM, Fan X. The role and regulation of catalase in respiratory tract opportunistic bacterial pathogens. *Microb Pathog*. 2014 Sep;74:50–8.
99. Boschi-Muller S, Branlant G. Methionine sulfoxide reductase: Chemistry, substrate binding, recycling process and oxidase activity. *Bioorganic Chem*. 2014 Dec;57:222–30.
100. Kumar C, Igarria A, D’Autreaux B, Planson A-G, Junot C, Godat E, et al. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J*. 2011 May 18;30(10):2044–56.
101. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015 Jun 5;97:55–74.
102. Wilkins MR, Sanchez J-C, Gooley AA, Appel RD, Humphrey-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996 Dec 1;13(1):19–50.
103. Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom*. 1984 Nov;11(11):601.
104. Biemann K. Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). In: McCloskey JA, editor. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 1990 [cited 2015 Jun 17]. p. 886–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687990934603>

105. Steen H, Mann M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Sep 1;5(9):699–711.
106. Savaryn JP, Catherman AD, Thomas PM, Abecassis MM, Kelleher NL. The emergence of top-down proteomics in clinical research. *Genome Med.* 2013 Jun 27;5(6):53.
107. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ. Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angew Chem Int Ed.* 2005 Nov 18;44(45):7342–72.
108. Voet D, Voet JG. *Biochemistry.* 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2011. 1428 p.
109. Walsh C. *Posttranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory.* Roberts and Company Publishers; 2006. 524 p.
110. Leeuwenburgh C, Rasmussen JE, Hsu FF, Mueller DM, Pennathur S, Heinecke JW. Mass Spectrometric Quantification of Markers for Protein Oxidation by Tyrosyl Radical, Copper, and Hydroxyl Radical in Low Density Lipoprotein Isolated from Human Atherosclerotic Plaques. *J Biol Chem.* 1997 Feb 7;272(6):3520–6.
111. Madian AG, Regnier FE. Proteomic Identification of Carbonylated Proteins and Their Oxidation Sites. *J Proteome Res.* 2010 Aug 6;9(8):3766–80.
112. Chiappetta G, Ndiaye S, Igbaria A, Kumar C, Vinh J, Toledano MB. Chapter 10 - Proteome Screens for Cys Residues Oxidation: The Redoxome. In: Enrique Cadenas and Lester Packer, editor. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 2010 [cited 2013 Oct 21]. p. 199–216. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007668791073010X>
113. Nagy P, Winterbourn CC. Chapter 6 - Redox Chemistry of Biological Thiols. In: Fishbein JC, editor. *Advances in Molecular Toxicology* [Internet]. Elsevier; 2010 [cited 2015 Jun 23]. p. 183–222. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872085410040063>
114. Gould N, Doulias P-T, Tenopoulou M, Raju K, Ischiropoulos H. Regulation of Protein Function and Signaling by Reversible Cysteine S-Nitrosylation. *J Biol Chem.* 2013 Sep 13;288(37):26473–9.
115. Csala M, Kereszturi É, Mandl J, Bánhegyi G. The Endoplasmic Reticulum As the Extracellular Space Inside the Cell: Role in Protein Folding and Glycosylation. *Antioxid Redox Signal.* 2012 May 15;16(10):1100–8.
116. Paulsen CE, Carroll KS. Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology, and Tools for Discovery. *Chem Rev.* 2013 Jul 10;113(7):4633–79.
117. Dalle-Donne I, Milzani A, Gagliano N, Colombo R, Giustarini D, Rossi R. Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(3):445–74.
118. Pastore A, Piemonte F. S-Glutathionylation signaling in cell biology: Progress and prospects. *Eur J Pharm Sci.* 2012 Aug 15;46(5):279–92.

119. Lo Conte M, Carroll KS. The Redox Biochemistry of Protein Sulfenylation and Sulfinylation. *J Biol Chem*. 2013 Sep 13;288(37):26480–8.
120. Hess DT, Matsumoto A, Kim S-O, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 février;6(2):150–66.
121. Forrester MT, Benhar M, Stamler JS. Nitrosative Stress in the ER: A New Role for S-Nitrosylation in Neurodegenerative Diseases. *ACS Chem Biol*. 2006 juillet;1(6):355–8.
122. Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. S-Nitrosylation in Cardiovascular Signaling. *Circ Res*. 2010 Mar 5;106(4):633–46.
123. Biteau B, Labarre J, Toledano MB. ATP-dependent reduction of cysteine–sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*. 2003 Oct 30;425(6961):980–4.
124. Paulsen CE, Carroll KS. Orchestrating Redox Signaling Networks through Regulatory Cysteine Switches. *ACS Chem Biol*. 2010 Jan 15;5(1):47–62.
125. Spadaro D, Yun B-W, Spoel SH, Chu C, Wang Y-Q, Loake GJ. The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. *Physiol Plant*. 2010 Apr 1;138(4):360–71.
126. Fujiwara N, Nakano M, Kato S, Yoshihara D, Ookawara T, Eguchi H, et al. Oxidative Modification to Cysteine Sulfonic Acid of Cys111 in Human Copper-Zinc Superoxide Dismutase. *J Biol Chem*. 2007 Dec 7;282(49):35933–44.
127. Zhang L, Ding X, Cui J, Xu H, Chen J, Gong Y-N, et al. Cysteine methylation disrupts ubiquitin-chain sensing in NF- κ B activation. *Nature*. 2012 Jan 12;481(7380):204–8.
128. Nagahara N, Matsumura T, Okamoto R, Kajihara Y. Protein cysteine modifications: (1) medical chemistry for proteomics. *Curr Med Chem*. 2009;16(33):4419–44.
129. Fréchal K, Kemp LE, Soldati-Favre D. Emerging roles for protein S-palmitoylation in *Toxoplasma* biology. *Int J Parasitol*. 2014 Feb;44(2):121–31.
130. Paul BD, Snyder SH. H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 juillet;13(8):499–507.
131. Go Y-M, Chandler JD, Jones DP. The cysteine proteome. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2015 Apr [cited 2015 Apr 30]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089158491500146X>
132. Wild CP. Complementing the Genome with an “Exposome”: The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Aug 1;14(8):1847–50.
133. Osaka I, Takayama M. Influence of hydrophobicity on positive- and negative-ion yields of peptides in electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2014 Oct 30;28(20):2222–6.
134. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and

- Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2002 May 1;1(5):376–86.
135. Ong S-E, Mann M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc*. 2007 Jan;1(6):2650–60.
136. de Souza N. microRNAs—subtler than you think. *Nat Methods*. 2008 Sep;5(9):753–753.
137. Yao X, Freas A, Ramirez J, Demirev PA, Fenselau C. Proteolytic ¹⁸O Labeling for Comparative Proteomics: Model Studies with Two Serotypes of Adenovirus. *Anal Chem*. 2001 Jul 1;73(13):2836–42.
138. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. 1999 Oct;17(10):994–9.
139. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Mol Cell Proteomics*. 2004 Dec 1;3(12):1154–69.
140. Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, et al. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Anal Chem*. 2003 Apr 1;75(8):1895–904.
141. Hansen KC, Schmitt-Ulms G, Chalkley RJ, Hirsch J, Baldwin MA, Burlingame AL. Mass Spectrometric Analysis of Protein Mixtures at Low Levels Using Cleavable ¹³C-Isotope-coded Affinity Tag and Multidimensional Chromatography. *Mol Cell Proteomics*. 2003 May 1;2(5):299–314.
142. Pan K-T, Chen Y-Y, Pu T-H, Chao Y-S, Yang C-Y, Bomgardner RD, et al. Mass Spectrometry-Based Quantitative Proteomics for Dissecting Multiplexed Redox Cysteine Modifications in Nitric Oxide-Protected Cardiomyocyte Under Hypoxia. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Mar 20;20(9):1365–81.
143. Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 10;100(12):6940–5.
144. Pratt JM, Simpson DM, Doherty MK, Rivers J, Gaskell SJ, Beynon RJ. Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes. *Nat Protoc*. 2006 Aug;1(2):1029–43.
145. Dupuis A, Hennekinne J-A, Garin J, Brun V. Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. *PROTEOMICS*. 2008 Nov 1;8(22):4633–6.
146. Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem*. 2012 Jul 8;404(4):939–65.

147. Karp NA, Huber W, Sadowski PG, Charles PD, Hester SV, Lilley KS. Addressing accuracy and precision issues in iTRAQ quantitation. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(9):1885–97.
148. Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008 Sep 1;45(5):549–61.
149. Chiappetta MG. Ecole Doctorale Inter///Bio (ED387) Interfaces de la Chimie, de la Physique et de l'Informatique avec la Biologie Ecole Doctorale de Biotechnologies [Internet]. CiteSeer; 2011 [cited 2015 Jul 2]. Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.397.8381&rep=rep1&type=pdf>
150. Leichert LI, Gehrke F, Gudiseva HV, Blackwell T, Ilbert M, Walker AK, et al. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 17;105(24):8197–202.
151. Sethuraman M, McComb ME, Heibeck T, Costello CE, Cohen RA. Isotope-coded Affinity Tag Approach to Identify and Quantify Oxidant-sensitive Protein Thiols. *Mol Cell Proteomics*. 2004 Mar 1;3(3):273–8.
152. McDonagh B, Ogueta S, Lasarte G, Padilla CA, Bárcena JA. Shotgun redox proteomics identifies specifically modified cysteines in key metabolic enzymes under oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Proteomics*. 2009 May;72(4):677–89.
153. Liu P, Zhang H, Wang H, Xia Y. Identification of redox-sensitive cysteines in the *Arabidopsis* proteome using OxiTRAQ, a quantitative redox proteomics method. *PROTEOMICS*. 2014 Mar 1;14(6):750–62.
154. Held JM, Danielson SR, Behring JB, Atsriku C, Britton DJ, Puckett RL, et al. Targeted Quantitation of Site-Specific Cysteine Oxidation in Endogenous Proteins Using a Differential Alkylation and Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry Approach. *Mol Cell Proteomics*. 2010 Jul 1;9(7):1400–10.
155. Le Moan N, Tacnet F, Toledano MB. Protein-thiol oxidation, from single proteins to proteome-wide analyses. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2008;476:181–98.
156. Brennan JP, Wait R, Begum S, Bell JR, Dunn MJ, Eaton P. Detection and Mapping of Widespread Intermolecular Protein Disulfide Formation during Cardiac Oxidative Stress Using Proteomics with Diagonal Electrophoresis. *J Biol Chem*. 2004 Oct 1;279(40):41352–60.
157. Groen A, Lemeer S, Wijk T van der, Overvoorde J, Heck AJR, Ostman A, et al. Differential Oxidation of Protein-tyrosine Phosphatases. *J Biol Chem*. 2005 Mar 18;280(11):10298–304.
158. Eaton P. Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jun 1;40(11):1889–99.

159. Brandes N, Reichmann D, Tienison H, Leichert LI, Jakob U. Using Quantitative Redox Proteomics to Dissect the Yeast Redoxome. *J Biol Chem*. 2011 Dec 2;286(48):41893–903.
160. Fu C, Wu C, Liu T, Ago T, Zhai P, Sadoshima J, et al. Elucidation of Thioredoxin Target Protein Networks in Mouse. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2009 Jul;8(7):1674–87.
161. Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal*. 2010;3(104):ra3–ra3.
162. Meyer Y, Buchanan BB, Vignols F, Reichheld J-P. Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology. *Annu Rev Genet*. 2009;43(1):335–67.
163. Machado AK, Morgan BA, Merrill GF. Thioredoxin Reductase-dependent Inhibition of MCB Cell Cycle Box Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1997 Jul 4;272(27):17045–54.
164. de Godoy LMF. SILAC yeast: from labeling to comprehensive proteome quantification. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1156:81–109.
165. Orlean P. Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics*. 2012 Nov;192(3):775–818.
166. Simpson RJ. Preparation of extracts from yeast. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011 Jan;2011(1):pdb.prot5545.
167. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. 2008 Dec;26(12):1367–72.
168. Hörth P, Miller CA, Preckel T, Wenz C. Efficient Fractionation and Improved Protein Identification by Peptide OFFGEL Electrophoresis. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Oct 1;5(10):1968–74.
169. Han X, He L, Xin L, Shan B, Ma B. PeaksPTM: Mass Spectrometry-Based Identification of Peptides with Unspecified Modifications. *J Proteome Res*. 2011 Jul;10(7):2930–6.
170. Chiappetta G, Basile A, Arra C, Califano D, Pasquinelli R, Barbieri A, et al. BAG3 Down-Modulation Reduces Anaplastic Thyroid Tumor Growth by Enhancing Proteasome-Mediated Degradation of BRAF Protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jan;97(1):E115–20.
171. Du Z-X, Meng X, Zhang H-Y, Guan Y, Wang H-Q. Caspase-dependent cleavage of BAG3 in proteasome inhibitors-induced apoptosis in thyroid cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 May 9;369(3):894–8.
172. Chiappetta G, Ammirante M, Basile A, Rosati A, Festa M, Monaco M, et al. The Antiapoptotic Protein BAG3 Is Expressed in Thyroid Carcinomas and Modulates Apoptosis Mediated by Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Mar;92(3):1159–63.

173. Rosati A, Graziano V, De Laurenzi V, Pascale M, Turco MC. BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. *Cell Death Dis.* 2011 Apr;2(4):e141.
174. Ammirante M, Rosati A, Arra C, Basile A, Falco A, Festa M, et al. IKK protein is a target of BAG3 regulatory activity in human tumor growth. *Proc Natl Acad Sci.* 2010 Apr 20;107(16):7497–502.
175. Bryantsev AL, Kurchashova SY, Golyshev SA, Polyakov VY, Wunderink HF, Kanon B, et al. Regulation of stress-induced intracellular sorting and chaperone function of Hsp27 (HspB1) in mammalian cells. *Biochem J.* 2007 Nov 1;407(3):407–17.
176. Taipale M, Tucker G, Peng J, Krykbaeva I, Lin Z-Y, Larsen B, et al. A Quantitative Chaperone Interaction Network Reveals the Architecture of Cellular Protein Homeostasis Pathways. *Cell.* 2014 Jul 17;158(2):434–48.
177. Acunzo J, Katsogiannou M, Rocchi P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), α B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Oct;44(10):1622–31.
178. Kim JA, Lee S, Kim D-E, Kim M, Kwon B-M, Han DC. Fisetin, a dietary flavonoid, induces apoptosis of cancer cells by inhibiting HSF1 activity through blocking its binding to the hsp70 promoter. *Carcinogenesis.* 2015 Jun 1;36(6):696–706.
179. Katsogiannou M, Andrieu C, Rocchi P. Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Syst Biol.* 2014;5:346.
180. Tonissen KF, Di Trapani G. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Mol Nutr Food Res.* 2009 Jan 1;53(1):87–103.
181. Cao W, Li M, Li J, Li C, Xu X, Gu W. Geranylgeranylacetone ameliorates lung ischemia/reperfusion injury by HSP70 and thioredoxin redox system: NF- κ B pathway involved. *Pulm Pharmacol Ther.* 2015 Jun;32:109–15.
182. Djavaheri-Mergny M, Javelaud D, Wietzerbin J, Besançon F. NF- κ B activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNF α -treated Ewing sarcoma cells. *FEBS Lett.* 2004 Dec 3;578(1–2):111–5.
183. Hall A. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Jan 21;28(1–2):5–14.
184. Samstag Y, John I, Wabnitz GH. Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration. *Immunol Rev.* 2013 Nov 1;256(1):30–47.
185. Arseneault R, Chien A, Newington JT, Rappon T, Harris R, Cumming RC. Attenuation of LDHA expression in cancer cells leads to redox-dependent alterations in cytoskeletal structure and cell migration. *Cancer Lett.* 2013 Sep 28;338(2):255–66.
186. Calderwood SK, Calderwood SK. Molecular Cochaperones: Tumor Growth and Cancer Treatment, Molecular Cochaperones: Tumor Growth and Cancer Treatment. *Sci Sci.* 2013 Apr 17;2013, 2013:e217513.

187. Mollapour M, Neckers L. Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2012 Mar;1823(3):648–55.
188. Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol.* 2012 Aug 11;87(1):19–48.
189. Dardalhon M, Kumar C, Iraqui I, Vernis L, Kienda G, Banach-Latapy A, et al. Redox-sensitive YFP sensors monitor dynamic nuclear and cytosolic glutathione redox changes. *Free Radic Biol Med.* 2012 Jun 1;52(0):2254–65.
190. Tabeling P. Recent progress in the physics of microfluidics and related biotechnological applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2014 Feb;25:129–34.
191. Seemann R, Brinkmann M, Pfohl T, Herminghaus S. Droplet based microfluidics. *Rep Prog Phys.* 2012;75(1):016601.
192. Chevallet M, Santoni V, Poinas A, Rouquié D, Fuchs A, Kieffer S, et al. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 1998 Aug;19(11):1901–9.
193. Fey SJ, Larsen PM. 2D or not 2D. *Curr Opin Chem Biol.* 2001 Feb 1;5(1):26–33.
194. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989 Oct 6;246(4926):64–71.
195. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1988 Aug 1;2(8):151–3.
196. Kelly RT, Page JS, Zhao R, Qian W-J, Mottaz HM, Tang K, et al. Capillary-Based Multi Nanoelectrospray Emitters: Improvements in Ion Transmission Efficiency and Implementation with Capillary Reversed-Phase LC-ESI-MS. *Anal Chem.* 2008 Jan 1;80(1):143–9.
197. Gale DC, Smith RD. Small volume and low flow-rate electrospray ionization mass spectrometry of aqueous samples. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1993 Nov 1;7(11):1017–21.
198. Wilm M, Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem.* 1996 Jan 1;68(1):1–8.
199. Valaskovic GA, Kelleher NL, Little DP, Aaserud DJ, McLafferty FW. Attomole-sensitivity electrospray source for large-molecule mass spectrometry. *Anal Chem.* 1995 Oct 15;67(20):3802–5.
200. Zubarev R, Mann M. On the Proper Use of Mass Accuracy in Proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2007 Mar 1;6(3):377–81.
201. Zubarev RA, Håkansson P, Sundqvist B. Accuracy Requirements for Peptide Characterization by Monoisotopic Molecular Mass Measurements. *Anal Chem.* 1996 Jan 1;68(22):4060–3.

202. Anderson NL, Anderson NG. The Human Plasma Proteome History, Character, and Diagnostic Prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002 Nov 1;1(11):845–67.
203. Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD. Serum and Plasma Proteomics. *Chem Rev*. 2007 Aug 1;107(8):3601–20.
204. Whiteaker JR, Zhao L, Zhang HY, Feng L-C, Piening BD, Anderson L, et al. Antibody-based enrichment of peptides on magnetic beads for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers. *Anal Biochem*. 2007 Mar 1;362(1):44–54.
205. Johnson RS, Martin SA, Biemann K, Stults JT, Watson JT. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal Chem*. 1987 Nov 1;59(21):2621–5.
206. Johnson RS, Martin SA, Biemann K. Collision-induced fragmentation of (M + H)⁺ ions of peptides. Side chain specific sequence ions. *Int J Mass Spectrom Ion Process*. 1988 Dec 29;86:137–54.
207. Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods*. 2007 Sep;4(9):709–12.
208. Giddings JC. Maximum number of components resolvable by gel filtration and other elution chromatographic methods. *Anal Chem*. 1967 Jul 1;39(8):1027–8.
209. Wiśniewski JR, Duś K, Mann M. Proteomic workflow for analysis of archival formalin-fixed and paraffin-embedded clinical samples to a depth of 10 000 proteins. *PROTEOMICS – Clin Appl*. 2013 Apr 1;7(3-4):225–33.
210. García MC, Hogenboom AC, Zappey H, Irth H. Effect of the mobile phase composition on the separation and detection of intact proteins by reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2002 May 31;957(2):187–99.
211. Chervet JP, Ursem M, Salzmänn JP. Instrumental Requirements for Nanoscale Liquid Chromatography. *Anal Chem*. 1996 May 1;68(9):1507–12.

Développement de nouvelles stratégies analytiques pour la caractérisation moléculaire des états d'oxydation à l'échelle protéomique

par **Shakir SHAKIR**

Résumé

L'analyse des modifications post-traductionnelles (PTMs) est une des contributions les plus importantes de la protéomique aux sciences du vivant. Malgré les progrès importants des techniques séparatives et de la spectrométrie de masse, la quantification des PTMs reste un défi analytique. Le nombre limité de PTMs identifiées robustement dans une recherche, la nécessité d'enrichissement et l'estimation quantitative basée sur un seul peptide ne représentent que les difficultés les plus évidentes. De plus, la quantification des PTMs doit toujours être associée au profil d'expression de la protéine pour éviter les faux positifs.

Nous avons développé de nouvelles stratégies analytiques de quantification des PTMs, en prenant en compte le niveau d'expression des protéines. Ces stratégies ont été appliquées à l'étude de l'oxydation des cystéines dans le cadre du stress oxydatif et de l'homéostasie redox.

La stratégie OcSILAC est une adaptation de la technique *biotin switch* au marquage métabolique des cultures cellulaires et a été appliquée à un modèle de levure n'exprimant pas la thiorédoxine réductase. OcSILAC apporte des améliorations techniques importantes et une innovation dans le traitement des données. Les résultats obtenus sont en accord avec le système redox de ce modèle. OcSILAC a ensuite été adaptée au fractionnement subcellulaire pour étendre la couverture du redoxome.

Une deuxième stratégie, OxiTMT, a été développée en se basant sur des *tandem mass tags* spécifiques de la cystéine. OxiTMT a été employée dans une étude de cellules d'*E. Coli* soumises à un traitement oxydatif. OxiTMT offre l'avantage d'une large gamme d'applications qui peut s'étendre aux tissus et aux biopsies.

Mots clés : protéomique, redoxome, cystéine, quantification, marquage isotopique, bio-informatique.

Abstract

The analysis of protein post-translational modifications (PTMs) is probably one of the most important contributions of proteomics to life sciences. Although separative techniques and mass spectrometry have improved tremendously, the quantitative analysis of PTMs remains an analytical challenge. The limited number of PTMs that can be robustly computed in a single research, the necessity of enrichment steps and performing quantitative estimations using only one peptide, are just the most evident difficulties faced. Furthermore, PTMs quantification should always be associated to protein expression levels to avoid false positives.

We have developed new analysis methods allowing the quantification of PTM changes while taking into account protein expression levels. These strategies were applied to the study of cysteine oxidation within the context of oxidative stress and redox homeostasis.

The first strategy, OcSILAC, is a revision of the biotin switch adapted to Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture; it was applied to the study of a thioredoxin reductase silenced yeast model. OcSILAC leads to important technical improvements and data analysis innovations. The results obtained are in agreement with the extensive existing literature concerning the yeast redox system. OcSILAC was then adapted to a subcellular fractionation kit to extend the coverage of the cysteine redoxome.

A second strategy called OxiTMT was developed based on cysteine specific tandem mass tags. OxiTMT was used to study *E. Coli* cells exposed to oxidative treatment. OxiTMT offers the advantage of a wide range of applications that can be extended to the study of tissues and biopsies.

Key words: proteomics, redoxome, cysteine, quantification, isotopic labeling, bio-informatics.